

Rapport du projet GANODIV : 12 Janvier 2013

Alba Zaremski ; Hubert de Franqueville

Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense*. Interactions avec *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* (Foe).



Sommaire

CHAPITRE 1 : État actuel et perspectives	5
-------------------------------------------------	----------

CHAPITRE 2 : Rapport scientifique	10
------------------------------------------	-----------

I. Etudes moléculaires de <i>Ganoderma</i>	10
---------------------------------------------------	-----------

Introduction

1. Optimisation de la méthode d'extraction pour la caractérisation moléculaire de <i>Ganoderma</i>	11
1.1. Matériel et méthodes	11
1.1.1. Matériel biologique	11
1.1.2. Extraction et dosage de l'ADN	12
1.2. Résultats	12
1.3. Discussion et Conclusion	15
2. Analyses des ITS de <i>Ganoderma boninense</i>	15
2.1. La PCR (« Polymerase Chain Reaction ») des ITS en vue de leur séquençage	15
2.2. PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	17
2.3. Nettoyage, alignement des séquences et construction des arbres phylogénétiques	18
2.4. Séquençage et correction des résultats bruts de séquençage	19
2.5. BLASTn	19
2.6. Résultats et Discussion	20
3. Etude phylogénétique du genre <i>Ganoderma</i> et de l'espèce <i>boninense</i>.	21
3.1. Constructions d'arbres phylogénétiques	21
3.2. Résultat et Discussion	23

II. Etude de faisabilité : Utilisation de la DHPLC (<i>Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes</i>) pour la caractérisation de la communauté microbienne responsable du dépérissement du palmier en huile, en particulier <i>Ganoderma boninense</i>.	24
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.1. Matériel et Méthodes	24
2.1.1. Matériel biologique	24
2.1.2. Extraction d'ADN :	24
2.1.3. Amplification d'ADN fongique :	24
2.1.5. Traitement des données et analyse des séquences	25
2.2. Résultats	26
2.2.1. Amplifications :	26
2.2.2. Séparation des produits d'amplification par DHPLC	27
2.2.3. Identification des pics obtenus en dHPLC par séquençage	29

Références bibliographiques	31
------------------------------------	-----------

Annexes	33
----------------	-----------

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma des régions ITS1, ITS2 et 5.8S de l'ADN ribosomal.».	10
Figure 2 : Séquence des amorces universelles fongiques ITS1 et ITS4 utilisées.	16
Figure 3 : Schéma des différentes phases de la PCR.	16
Figure 4: Photographie en lumière UV d'un gel de contrôle.	17
Figure 5 : Exemple de chromatogramme d'une séquence d'ITS4myc.	19
Figure 6 : Résultats de BLASTn.	20
Figure 7 : Arbre phylogénétique des 12 séquences.	23
Figure 8 : L'appareil utilisé : Wave [®] System (Transgenomic)	25
Figure 9 : Photographies des gels de migration des produits d'amplification	27
Figure 10 : Exemples de chromatogrammes obtenus pour l'analyse DHPLC	28/29
Figure 11: Arbre phylogénétique des 5 séquences obtenues expérimentalement ayant donné un résultat d'homologie positif par BLASTn avec des séquences du même genre et/ou espèce et/ou famille pour <i>Ganoderma boninense</i> . Arbre construit par « neighbor-joining ».	30

Liste des tableaux et des Annexes

Tableau 1 : Méthode d'extraction par Le Quéré et al. (2002) avec purification chloroforme et isopropanol.	14
Tableau 2 : Méthode d'extraction en utilisant le kit « Invitrogen PureLink Plant Total DNA purification ».	14
Tableau 3 : Comparaison des résultats d'absorbance (A1, A1/A2, A1/A3) et de concentration d'ADN des extraits en fonction de la quantité de matière fongique initiale utilisée.	14

Liste des Annexes

Annexe 1 : Principales caractéristiques des échantillons étudiés : -----	33/34
Annexe 2a : Protocole d'extraction de Le Quéré et al. (2002)-----	35
Annexe 2b : Procotole d'extraction Invitrogen -----	36
Annexe 3: DHPLC : Liste des meilleurs résultats du BLAST obtenus par comparaison de la séquence obtenue aux bases de données pour les autres échantillons -----	39
Annexe 4 : DHPLC : Alignement de séquence effectué avec les séquences obtenues et les séquences de NCBI en PAUP -----	40
Annexe 5 : DHPLC : Les séquences de NCBI en fasta-----	45

Préface

Ce document est constitué de deux chapitres. Le premier chapitre développe l'état actuel de la réflexion en incluant un rappel des principales connaissances acquises, les principaux travaux réalisés en 2012, les principaux résultats obtenus, et aborde les perspectives pour ce projet. Le deuxième chapitre présente le rapport scientifique constitué des méthodes utilisées, des résultats obtenus et des discussions, de la référence bibliographique et des annexes.

CHAPITRE 1 : État actuel et perspectives

Rappel des principales connaissances acquises

Les études ultérieures (Rapport GANODIV de 2009 à 2011) ont révélé, d'une part que les échantillons, en particulier ceux provenant des tissus infestés, sont naturellement contaminés par plusieurs souches de microorganismes, (bactéries, ascomycètes, *fungi imperfecti*, etc.,) et d'autre part que ces micro-organismes ne sont pas, à ce jour, cultivables en condition de laboratoire. Ainsi, des adaptations de la méthode d'extraction de l'ADN fongique se sont révélées nécessaires pour analyser l'ADN des champignons visés parmi l'ensemble des organismes associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à huile, en particulier le *Ganoderma* et le *Fusarium*.

Ces études ont montré également qu'il était nécessaire d'assurer le diagnostic précoce d'un polyparasitisme car l'infection par plusieurs espèces différentes est possible (*Ganoderma* et *Fusarium* par exemple, etc...).

En 2012, les techniques devront donc identifier spécifiquement *Ganoderma* et *Fusarium*, qui sont les agents responsables des infections les plus fréquentes et les plus destructives. Elles devront également identifier et décrire des micro-organismes eucaryotes qui ne sont pas à ce jour cultivables en condition de laboratoire (Rapport GANODIV de 2009 à 2011).

C'est pourquoi, en plus des techniques de caractérisation classiquement utilisées telles la PCR et le séquençage, nous allons nous orienter vers l'obtention de profils de population microbienne pour nos échantillons en utilisant la technique de la DHPLC (*Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes*). D'après la littérature, cette technique est innovante car elle n'a jamais été utilisée pour la caractérisation de ces champignons associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à huile, *Ganoderma* et *Fusarium*.

Les principaux travaux réalisés en 2012:

En 2012, pour le genre *Ganoderma*, nous avons élargi notre échantillonnage à d'autres origines géographiques, notamment indonésienne, guyanaise, calédonienne, européenne.

- Études mycologiques et moléculaires pour le genre *Ganoderma* à partir de 61 échantillons: collecte de champignons ; production de mycélium pur ; construction d'une collection de champignons principalement du genre *Ganoderma*; optimisation et standardisation de la méthode d'extraction, de purification et d'amplification de l'ADN ; identifications et caractérisations moléculaires ; analyses des données (à compléter et à finaliser en 2013) : constructions d'arbres phylogénétiques, interprétation des données.

- Étude de faisabilité : utilisation de la DHPLC (*Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes*) pour la caractérisation de *Ganoderma boninense* à partir de 29 échantillons provenant des plantations de Tanah Gambus. Les mêmes techniques citées précédemment ont été utilisées en plus de la technique DHPLC.

- Étude de faisabilité : étude comparée de l'action de trois souches de *Fusarium Oxysporum* dans le palmier à huile : Dans cette étude, l'aptitude de trois souches de *Fusarium oxysporum* à induire des symptômes de dépérissement du palmier à huile contre la fusariose est évaluée. Des plantules saines âgées de 2 mois (au stade 2 feuilles) ont été infectées de manière artificielle avec trois souches de *Fusarium Oxysporum* : une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* provenant du Cameroun et connue pour son pouvoir pathogène responsable de la fusariose du palmier à huile et deux espèces de *Fusarium oxysporum* provenant du Liberia et jamais étudiées à ce jour pour leur pouvoir pathogène.

- Etablissement d'un site web dédié à nos propres séquences de basidiomycètes (à compléter et finaliser en 2013) : L'utilisation du fragment ITS1/ITS4 pour la caractérisation des champignons présente plusieurs avantages notamment la bonne reproductibilité d'obtention des séquences et l'existence d'une importante quantité de séquences en banque de données internationales (NCBI). La variabilité de ce fragment, en particulier pour les régions ITS1 et 5,8S, est souvent suffisante, mais reste toujours dépendante de la qualité des séquences de la banque internationale NCBI, pour caractériser le niveau taxonomique du genre et de l'espèce de la souche. C'est pourquoi, pour remédier à cet inconvénient, nous ce site a été créé et sera dédié seulement à nos propres séquences de la région ITS de l'ADN ribosomale (ITS1, 5,8S et ITS2). Ce site permettra aisément d'analyser et de conclure sur les

relations phylogénétiques entre des espèces de champignons associés aux phénomènes de dépérissement des palmiers à huile tels que *Ganoderma* et *Fusarium*. A terme, l'ajout de nouveaux échantillons provenant des différentes régions du monde, en particulier les régions tropicales encore trop peu échantillonnées à ce jour et répertoriées dans les banques internationales, générera des travaux éclairants sur l'évolution adaptative de *Ganoderma* et de *Fusarium* dans le palmier à huile.

- Valorisation des résultats: Publication concernant la détermination du seuil minimal fongique pour l'obtention d'un extrait d'ADN de qualité de *Ganoderma boninense* issu des plantations de palmier à huile de Tanah-Gambus, Indonésie (à finaliser en 2013;

Les principaux résultats obtenus en 2012 :

1) Etudes mycologiques et moléculaires pour le genre *Ganoderma* :

- Détermination d'un seuil minimal fongique pour l'obtention d'un extrait d'ADN de qualité à partir de 61 échantillons d'origines différentes: tissus infestés ; mycélium pur, fructifications fongiques de *Ganoderma* et tissus infestés de palmier à huile : **40 mg (0.004g)** de broyat fongique est la quantité optimum de matériel nécessaire.

- Développement fiable d'un plan d'expérience rigoureux dans le but d'optimiser les conditions d'extraction de l'ADN et d'amplification des séquences cibles ;

- Obtention d'un outil moléculaire fiable pour le diagnostic précoce des champignons causant le dépérissement dans le palmier à huile, en particulier *Ganoderma boninense* et *Fusarium oxysporum*.

2) Étude phylogénétique du genre *Ganoderma* :

- à partir des arbres phylogénétiques : mises en évidence de 3 clades distincts où les espèces tendent à se grouper selon les genres, l'espèce, et la région géographique :1) clade formé par *Ganoderma webernarium* et *Ganoderma ahjiinii* provenant d'Europe ;2) clade rassemblant deux *Ganoderma* de Tanah Gambus en Indonésie ; 3) clade formé par un *Ganoderma australe* et un *Ganoderma sp.* de Nouvelle-Calédonie. A terme de ce travail, cette étude devra établir les relations phylogénétiques notamment au sein du genre et de l'espèce *Ganoderma boninense*.

3) Étude des communautés fongiques du bois réalisée par D-HPLC (*Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes*) :

Les pics obtenus en DHPLC ont été récoltés et séquencés. Le séquençage des collectes a permis d'attribuer un nom d'espèce aux pics par comparaison aux bases de données nucléotidiques. Un arbre a été construit par « neighbor-joining » à partir des 5 séquences obtenues expérimentalement ayant donné un résultat d'homologie positif par BLASTn avec des séquences du même genre et/ou espèce et/ou famille pour *Ganoderma boninense*. Les échantillons des souches « témoin » de *Ganoderma boninense* issues des plantations de Tanah Gambus se sont situées parfaitement dans le groupe des *Ganoderma boninense*.

Cette méthode donne également des indications taxonomiques sur le consortium des micro-organismes infestant le palmier à huile, qui ne sont pas à ce jour cultivables en laboratoire.

4) Étude de faisabilité : étude comparée de l'action de trois souches de *Fusarium Oxysporum* dans le palmier à huile :

Après 6 mois d'observations hebdomadaires macroscopiques et microscopiques, les analyses n'ont pas donné de résultats concluants : la méthode n'est pas adaptée en laboratoire.

Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons pu développer et optimiser les techniques d'extraction de l'ADN en vue de l'obtention de séquences sur des matériels d'origines différentes et parfois difficiles à amplifier. Cette optimisation permet d'établir au sein du laboratoire un protocole de routine pour les études futures portant sur la diversité des champignons du genre *Ganoderma* et *Fusarium*.

Grâce au protocole mis au point, nous avons pu caractériser 61 échantillons de *Ganoderma*, d'Indonésie, de Guyane, de Nouvelle Calédonie et d'Europe en nous basant sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 avec les séquences de la base de données GenBank du NCBI.

Après une sélection de nos séquences obtenues expérimentalement ou issues de la banque de données NCBI, nous avons procédé à la construction d'arbres phylogénétiques par la méthode du « Neighbor-Joining » permettant de mettre en évidence des groupes taxonomiques de *Ganoderma* d'Europe et d'Indonésie.

La technique de la DHPLC (*Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes*) permet d'identifier des micro-organismes qui font parti du consortium des micro-organismes infestant le palmier à huile mais qui ne sont pas cultivables en condition de laboratoire. Cette technique permet de caractériser parfaitement *Ganoderma boninense* des plantations de Tanah-Gambus en Indonésie.

Perspectives de recherche :

- D'après les observations au champ d'Hubert De Franqueville : La présence de structures stromatiques entourant la racine semble être le lieu principal de pénétration du mycélium (Breton et *al.*, 2005).

Il serait intéressant de coupler ces macro-observations à des analyses microscopiques, histologiques, moléculaires et mycologiques. Ces études permettront de mieux caractériser cette zone d'interaction entre l'hôte et le champignon.

- D'après les observations aux champs en Indonésie d'Emmanuelle Lamade : On note sur les stipes attaqués par le *Ganoderma*, une fois le palmier mort, que la principale zone d'occupation de *Ganoderma* (ou zone de dégradation de la matière organique par ce champignon) se trouve à la base du stipe, d'où le nom de la maladie "basal stem rot". Il se trouve que cette zone coïncide avec une des réserves en carbohydrates du palmier (réserve de sucre soluble - du glucose -). Cette localisation d'une réserve en glucose à la base du stipe est assez spécifique au palmier. A ce jour, les études en physiologie n'ont pas permis de bien identifier le rôle dans la production des régimes de ce glucose; mais il pourrait s'agir d'une réserve secondaire à celle formée par l'amidon au sommet du stipe, qui pourrait être sollicitée lors d'une période sèche ou pour compléter une demande plus forte en carbone lors du développement du palmier. On note une variation dans le contenu en glucose due : au matériel végétal ; à l'application de K (potassium) ; aux régimes en place sur la couronne, etc.. ; en fonction aussi de la croissance du système racinaire (nous savons que le *Ganoderma* se développe suivant une grande hydromorphie). Celle-ci limite la croissance du système racinaire et par conséquent la réserve en glucose augmente).

Il serait donc intéressant d'analyser le mode d'attaque du *Ganoderma* qui semble se développer grâce à cette réserve en glucose.

CHAPITRE 2 : Rapport scientifique

I. Etudes moléculaires de *Ganoderma*

Introduction

Au cours de ce travail, toutes ces études ont été menées sur les séquences d'ADNr de 61 champignons du genre *Ganoderma* disponibles au laboratoire, et de provenance différentes : Indonésie, Guyane, Europe, notamment France. Cette estimation de la diversité au sein du genre *Ganoderma* a été réalisée en analysant le polymorphisme des séquences d'ADNr ITS1-5.8S-ITS2 par comparaison de séquences par BLASTn. Des constructions d'arbres phylogéniques ont été également effectuées dans le but de mettre en évidence différents groupes au sein de ces différentes espèces.

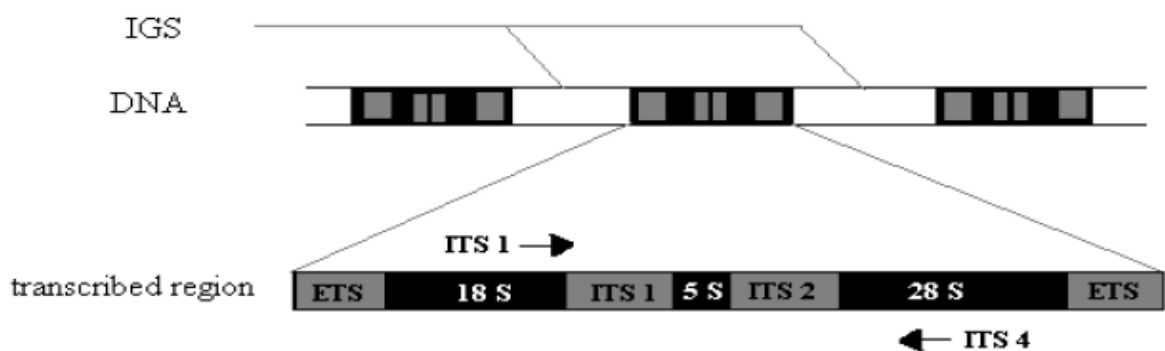


Figure 1 : Schéma des régions ITS1, ITS2 et 5.8S de l'ADN ribosomal. Représentation schématique du locus de l'ADN ribosomique et des ITS (« Internal Transcribed Spacer ») chez les organismes eucaryotes. Les flèches noires représentent les amorces utilisées en écologie moléculaire des champignons. Ce schéma permet de localiser le site de fixation de ces amorces spécifiques nécessaire à l'amplification des ITS. Les ETS correspondent aux « External Transcribed Spacer » et les IGS sont les « non-transcribed intergenic spacers ».

1. Optimisation de la méthode d'extraction pour la caractérisation moléculaire de *Ganoderma*.

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Matériel biologique

Echantillons fongiques

Pour cette étude, nous disposons de 61 échantillons fongiques de différentes origines géographiques : Guyane, Indonésie, Libéria, Bénin, Europe. Les échantillons sont conservés sous forme de carpophores déshydratés, de carpophores congelés et de cultures mycéliennes sur boîte de Pétri. La liste complète présentant les caractéristiques de ces échantillons est présentée en Annexe 1.

Nous disposons de : 5 échantillons de carpophores déshydratés d'individus appartenant au genre *Ganoderma*, fournis par l'équipe du laboratoire de Mycologie de l'Université de Caen ; 18 carpophores congelés à -80°C d'individus appartenant au genre *Ganoderma*, provenant des plantations de palmiers à huile de Tanah Gambus, en Indonésie ; 11 échantillons de carpophores déshydratés de *Ganoderma* spp. conservés dans l'Herbier du CIRAD, et provenant de Nouvelle-Calédonie ; 4 échantillons de carpophores déshydratés de *Ganoderma* de la collection du CIRAD et provenant de Guyane ; 20 échantillons de matériel fongique du genre *Ganoderma* de la récolte de 2012 à Tanah Gambus ; 3 souches de référence : 2 souches de référence du laboratoire CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Center ; Utrecht, Pays-Bas) pour le genre *Ganoderma* en culture sur boîte de Pétri, comprenant *Ganoderma ahjiinii* et *Ganoderma webernarium*, et 1 souche CIRAD NJ3 de *Ganoderma boninense*.

- L'étude se fera également sur 5 souches de *Fusarium* sp. conservées en culture sur boîte de Pétri, fournies par PalmElit

Préparation des broyats

Les échantillons ont dans un premier temps été nettoyés à l'eau distillée afin de réduire les risques de contamination superficielle par des résidus de sol, des moisissures ou des lichens. Nous avons ensuite procédé à un broyage mécanique en utilisant une râpe et/ou un broyeur électrique, stérilisés entre chaque échantillon. Nous avons utilisé entre 1 et 3 grammes de tissu fongique, selon la nature de l'échantillon. Les broyats sont conservés dans des tubes Falcon

stériles de 50 ml à -80°C pour une utilisation ultérieure. Une partie de ces broyats est reprise pour être broyée plus finement dans l'azote liquide en utilisant un mortier et un pilon en marbre. La qualité du broyage est déterminante de la qualité des ADN extraits.

1.1.2. Extraction et dosage de l'ADN

Nous avons procédé à **la comparaison de 2 méthodes** afin de déterminer la technique d'extraction la plus rapide et efficace en terme de pureté de l'échantillon final. Nous avons dans un premier temps réalisé une comparaison entre les résultats de dosage par absorbance de 10 extraits d'ADN obtenus avec le kit *Invitrogen PureLink Plant Total DNA Purification Kit* et avec le protocole décrit par Le Quéré *et al.* (2002) suivi d'une purification au chloroforme et à l'isopropanol pour éliminer au maximum les polysaccharides. Les détails des deux protocoles d'extraction d'ADN sont présentés en annexe 2a et 2b.

Les échantillons d'ADN ont été dosés en utilisant un spectromètre *BioSpec Mini* de marque *Shimadzu*. L'absorbance A1 (260 nm), les ratios A1/A2 (260/280 nm) et A1/A3 (260/230 nm) ainsi que la concentration de notre ADN ont été mesurés afin de déterminer le succès de notre extraction ainsi que la pureté de nos échantillons. Les ratios A1/A2 et A1/A3 doivent se rapprocher de 1,8 pour pouvoir qualifier les échantillons de « purs ». Nous avons utilisé une cellule de précision Hellma en Quartz SUPRASIL « en U » permettant d'utiliser uniquement 10 µL de nos extraits, tout en ayant un trajet optique de 1 centimètre nécessaire pour les mesures d'absorbance. Le protocole utilisant le kit *Invitrogen* a ensuite été optimisé et nous avons déterminé la quantité optimale de matériel fongique à utiliser pour obtenir un extrait d'ADN présentant des valeurs de concentration d'ADN et de pureté satisfaisantes en réalisant une plage de 4 tubes, en utilisant 40, 60, 80 et 100 mg de matériel fongique. Le protocole modifié est détaillé en annexe 2b.

1.2. Résultats

Analyses culturelles, anatomiques et morphologiques des sporophores récoltés sur le palmier à huile.

D'après le mycologue Mr Welti Stéphane de la Faculté de Pharmacie de Lille, les observations anatomiques et morphologiques montrent que le sporophore est un sublaqué, c'est à dire entre *Ganoderma* et *Elfvigia*.

Il est brillant ; les pileocystides sont à peine épaissis à leur extrémité ; ils sont amyloïdes ; les spores sont oblongues et finement échinulées ; la surface porée est blanche au départ puis noircie ; il est assez coriace.

Comparaison et optimisation des méthodes d'extraction de l'ADN et vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN de chaque échantillon.

La méthode décrite par Le Quéré *et al.* (2002) suivi d'une purification au chloroforme et à l'isopropanol (tableau 1), nous permet d'observer les valeurs de D.O. moyennes suivantes : A_1 (260 nm) = 0,74 ; A_1/A_2 (260/280 nm) = 1,81 ; A_1/A_3 (260/230 nm) = 0,52 et une concentration en ADN de $14,18 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

L'utilisation du kit *Invitrogen* (tableau 2) avec un protocole optimisé nous permet d'observer des valeurs de D.O. moyennes de : A_1 (260 nm) = 0.44 ; A_1/A_2 (260/280 nm) = 1.91 ; A_1/A_3 (260/230 nm) = 0.83 et une concentration en ADN de $11,82 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

La valeur d'absorbance A_1 correspond au pic d'absorbance à 260 nm provoqué par la présence d'ADN, le ratio A_1/A_2 (260/280 nm) correspond à la quantité de polysaccharides présents dans notre extrait (valeur optimale = 1,8), et le ratio A_1/A_3 (260/230 nm) correspond à la quantité de sels présents dans notre extrait (valeur optimale = 1,8).

Le kit *Invitrogen* avec un protocole optimisé nous permet d'obtenir des valeurs des ratios A_1/A_2 et A_1/A_3 les plus satisfaisantes pour nos objectifs de séquençage des ITS.

Les résultats présentés dans le tableau 3 nous permettent de constater que, dans nos conditions expérimentales, **40 mg de broyat fongique étaient la quantité *optimum* de matériel nécessaire à obtention d'un extrait d'ADN de qualité.**

Tableau 1 : Méthode d'extraction de Le Quéré et al. (2002) avec purification chloroforme isopropanol

Vf: 50 µl

#	A1 (260 nm)	A1/A2 (260/280 nm)	A1/A3 (260/230 nm)	[ADN ng.µl ⁻¹]
GPH 10	0,59	1,633	0,45	14,58
GPH 12	1,51	1,74	0,52	24,38
GPH 15	1,34	1,76	0,465	21,09
GPH 16	0,47	1,89	0,53	8,67
GPH 17	0,49	1,79	0,5	11,32
GPH 18	x	x	x	x
GPH 19	x	x	x	x
GPH 20	0,46	1,9	0,64	11,83
GPH 21	x	x	x	x
GPH 22	0,34	1,94	0,54	7,41

Tableau 2 : Méthode d'extraction avec le kit "Invitrogen PureLink Plant Total DNA purification"

#	A1 (260 nm)	A1/A2 (260/280 nm)	A1/A3 (260/230 nm)	[ADN ng.µl ⁻¹]
GPH 10	0,29	1,9	0,99	19,88
GPH 12	0,39	1,93	1,04	26,04
GPH 15	0,51	1,96	1,25	33
GPH 16	0,22	2,02	0,91	13,16
GPH 17	0,24	1,97	0,89	14,7
GPH 18	1,54	1,57	0,42	99,8
GPH 19	0,1	1,76	0,33	6,4
GPH 20	0,136	1,99	0,78	7,62
GPH 21	0,15	1,98	0,8	9,06
GPH 22	0,11	2,06	0,87	6,66

Tableau 3 : Comparaison des résultats d'absorbance (A1, A1/A2, A1/A3) et de concentration d'ADN de nos extraits en fonction de la quantité de matière fongique initiale utilisée. L'échantillon utilisé pour cette comparaison est *Ganoderma sp.* GPH 13.

Quantité de matière fongique (mg)	A1 (260 nm)	A1/A2 (260/280 nm)	A1/A3 (260/230 nm)	[ADN] (ng.µl ⁻¹)
40	0,22	1,84	1,11	7,81
60	0,21	1,92	1,12	7,71
80	0,31	1,86	0,93	9,47
100	0,19	1,82	1,39	8,15

1.3. Discussion et Conclusion

Comparaison et optimisation des méthodes d'extraction de l'ADN et vérification de la pureté et de la concentration de l'ADN de chaque échantillon

En ce qui concerne le broyage de nos échantillons, il s'est avéré long et fastidieux. Cela est principalement dû aux impératifs de stérilité afin de ne pas contaminer nos échantillons entre eux. Il serait donc utile de revoir le protocole de broyage afin de le rendre moins laborieux, en utilisant un broyeur à billes par exemple.

En ce qui concerne l'extraction de l'ADN, nous avons pu observer que les deux méthodes utilisées fournissaient des résultats similaires en termes de concentration d'ADN finale de nos extraits, mais présentaient des divergences en ce qui concerne les ratios d'absorbance A1/A3 (260/230 nm). En effet, ce dernier était près de 37% supérieur lorsque nous avons utilisé le protocole *Invitrogen PureLink Plant Total DNA Purification Kit*. Il reste néanmoins faible (< 1), et nous souhaiterions l'améliorer lors des travaux ultérieurs car nous soupçonnons les contaminants d'inhiber partiellement ou totalement la réaction de PCR pour certains échantillons. De plus, le protocole utilisant le Kit *Invitrogen* présente l'avantage d'être rapide et simple à réaliser, tout en nous permettant d'éviter l'étape longue et parfois laborieuse de resuspension des culots d'ADN grâce aux colonnes d'extraction.

La quantité de broyat fongique idéale pour l'extraction s'est avérée être de 40 mg, ce qui est avantageux car la poudre de champignon déshydratée est très hydrophile et absorbe facilement le tampon d'extraction fourni avec le kit. Ainsi, en diminuant la quantité de matériel fongique, cela nous permet de mieux suspendre notre échantillon broyé et d'avoir une meilleure visibilité lors des étapes de transfert des surnageants, ce qui peut s'avérer très important pour améliorer les ratios A1/A2 et A1/A3 de nos extraits finaux. Nous avons toutefois du doubler la quantité de tampon de suspension utilisée (de 250 à 500 µl) ainsi que de SDS (de 15 à 30 µl), de RNase A (de 15 à 30 µl) et de tampon de précipitation (de 100 à 200 µl) afin d'obtenir des échantillons manipulables.

2. Analyses des ITS de *Ganoderma boninense*

2.1. L'amplification par PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») des ITS en vue de leur séquençage

La PCR est une réaction enzymatique permettant la réplique *in vitro* d'un fragment spécifique de l'ADN. Dans notre cas, nous amplifions la région ITS1 – 5.8S – ITS2 de l'ADN ribosomal en utilisant la paire d'amorces universelles fongiques ITS1/ITS4 (*cf.* Figure 2). La

PCR a été réalisée sur une plaque de 96 puits coniques, dans un volume réactionnel final de 50 μ L, en utilisant 5 μ L de produit d'extraction, 4 μ L de dNTP, 10 μ L de tampon white 5X, 2 μ L de chacune des amorces fongiques universelles ITS1myc et ITS4myc, 0,3 μ L de *Phusion* DNA Taq polymérase Hot Start II (2U/ μ L) et 26,7 μ L d'eau millipore stérile. Nous réalisons 30 cycles de variation de température, dont le détail est présenté Figure 5, en utilisant un thermocycleur de marque *Mastercycler Eppendorf*. Huit témoins sans matrice ADN sont également réalisés afin de tester la présence éventuelle d'ADN contaminants dans nos réactifs et tampons. Les produits de PCR obtenus sont alors conservés à -20°C dans l'attente de la réalisation des gels de contrôle et de leur envoi pour séquençage. Les échantillons ainsi obtenus ont été soumis à une migration par électrophorèse de 90 minutes sur gel d'agarose 2,5% à 102 puits. Chaque puits est chargé de 10 μ L de produit PCR auxquels ont été ajoutés 2 μ L de bleu de charge « 6xDNA loading ». Nous utilisons également des marqueurs de taille de type *Generuler 50 bp DNA ladder (Fermentas)* afin d'obtenir une échelle pour la lecture du gel. Une fois la migration terminée, le gel est révélé dans un bain de bromure d'éthidium (BET, 10 mg/ml), molécule qui s'intercale entre les bases de l'ADN et présente une fluorescence à 590 nm. L'observation sous lumière UV (590 nm) permet d'estimer l'intensité de la réaction de PCR, de vérifier l'intégrité et la taille de nos fragments d'ADN et leur position exacte dans le gel avant d'envoyer nos échantillons au laboratoire MacroGen pour les séquencer.

ITS1myc	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGC 3'
ITS4myc	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Figure 2 : Séquence des amorces universelles fongiques ITS1 et ITS4 utilisées (D'après White *et al.* 1990 ; Gardes et Bruns, 1993).

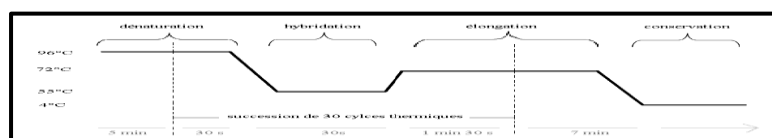


Figure 3 : Schéma des différentes phases de la PCR.

Une première phase de dénaturation initiale à 96°C de 5 minutes est suivie par 30 cycles constitués d'une phase de dénaturation de 30 secondes à 96°C, puis d'une phase d'hybridation de 30 secondes à 55°C, et enfin d'une phase d'élongation de 1 minute 30 secondes à 72°C. Enfin, une phase finale d'élongation à lieu à 72°C pendant 7 minutes. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C ou à -20°C pour de plus longue durée.

2.2. PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

Le succès de la réaction de polymérisation a été vérifié par migration de nos produits de PCR sur gel d'agarose (Figure 4). Les puits 13, 25 et 91 à 96 constituent des témoins négatifs de ce contrôle. Les 4 premiers échantillons correspondent à des *Ganoderma* spp. de Nouvelle-Calédonie de l'Herbier du LSTM. Nous pouvons observer pour chacun d'entre eux une bande amplifiée d'environ 600 pb, au signal faible mais néanmoins détectable.

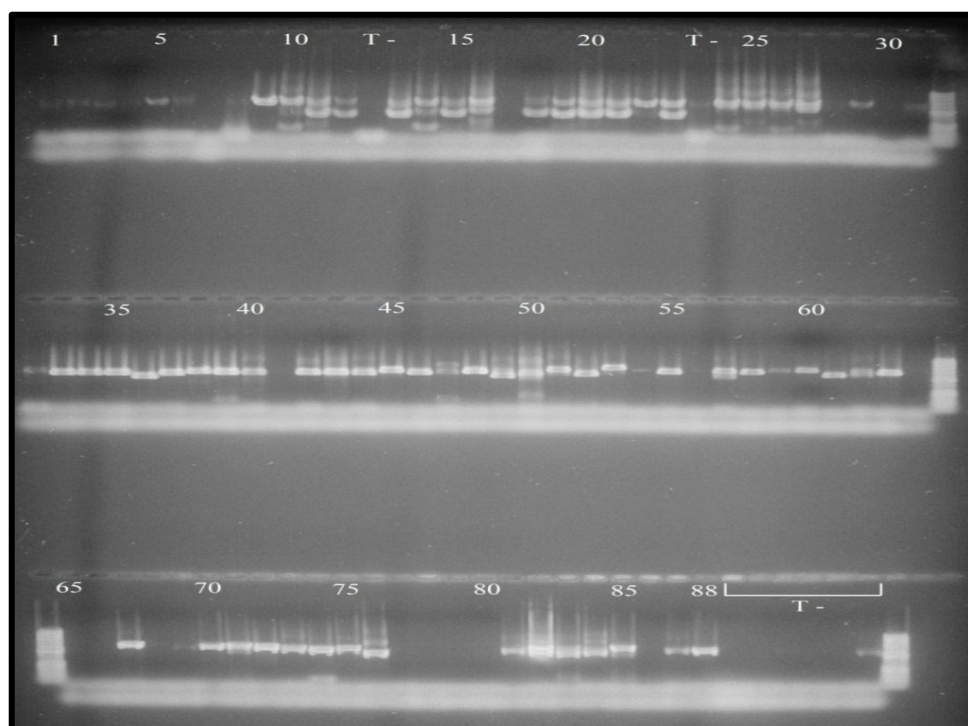


Figure 4 : Photographie en lumière UV d'un gel de contrôle (agarose 2,5%) de nos échantillons après PCR. Les puits 13, 23 et 89 à 96 constituent des témoins négatifs.

Les échantillons 5 à 9 correspondent à des *Ganoderma* spp. de France fournis par le laboratoire de Mycologie de l'Université de Caen. Trois d'entre eux présentent une amplification réussie, avec une seule bande détectable d'une taille correspondant là encore à celle attendue pour le produit d'amplification, tandis que deux d'entre eux ne présentent aucune amplification.

Les échantillons 10 à 12, 14 à 24 et 26 à 29 correspondent à des *Ganoderma* spp. provenant de plantations de palmiers à huile situées à Tanah Gambus à Sumatra, en Indonésie. Nous observons pour 16 d'entre eux plusieurs produits d'amplification de taille variable, ce qui

suggère un problème de contamination. L'échantillon 18 ne présente pas d'amplification visible, tandis que l'échantillon 23 présente une seule bande visible d'environ 600 pb.

Les échantillons 35, 41 et 42 sont des *Ganoderma* spp. de Nouvelle-Calédonie et présentent tous trois des amplifiats d'environ 600 pb. Nous utiliserons ces échantillons comme référence dans le traitement de nos résultats.

Enfin, les échantillons 36 à 40 constituent nos 5 souches de *Fusarium*, pour lesquelles l'amplification semble également être un succès, avec des bandes uniques d'environ 600 pb.

2.3. Nettoyage, alignement des séquences et construction des arbres phylogénétiques

Après validation de nos amplifications par le gel de contrôle, 20 µL des produits de PCR ont été envoyés au laboratoire européen de MacroGen pour le séquençage de nos échantillons. Une fois les séquences obtenues, nous les corrigeons en utilisant le logiciel *CodonCode*, particulièrement adapté pour cette tâche.

Nous procédons ensuite à la comparaison des séquences « reverse » obtenues *via* le primer ITS4myc par BLASTn (« Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide ») avec les séquences de la base de données GenBank du NCBI (« National Center For Biotechnology Information »). Cet algorithme nous permet d'obtenir une liste d'espèces présentant un certain degré d'homologie de nos séquences avec les séquences de la base de données considérée. Nous considérons uniquement le score d'homologie en termes de nombre de paires de bases similaires, et non pas le pourcentage d'homologie. Les séquences de nos échantillons et les séquences de la base de données du NCBI présentant un score d'homologie élevé avec ces dernières sont ensuite assemblées dans des fichiers Fasta *via* le logiciel BioEdit, et séparées afin de construire des arbres phylogénétiques contenant respectivement les séquences obtenues expérimentalement, et leurs séquences proches de la base de données du NCBI.

L'alignement des séquences sélectionnées est réalisé avec le logiciel de phylogénie *MEGA5*, en utilisant la méthode ClustalW. Nous pouvons alors procéder à l'élaboration d'arbres phylogénétiques avec ce même logiciel en utilisant la méthode du « neighbor-joining » avec le modèle de « maximum likelihood », en utilisant un *bootstrap* de 1000 réplifications. Un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences des *Ganoderma* pour lesquelles nous avons constatés une congruence entre l'identification morpho-anatomique et le résultat de BLASTn.

2.4. Séquençage et correction des résultats bruts de séquençage

De façon générale, les séquences « front » (3'-5') utilisant ITS1myc étaient de qualité insuffisante et demandaient beaucoup de travail pour être exploitables quand cela était possible. Nous avons alors décidé de nous focaliser sur les séquences « reverse » (5'-3') utilisant ITS4myc, plus aisées à interpréter (Figure 5). Les résultats présentés devront être complétés par l'analyse des séquences « front » puis l'assemblage « front-reverse ».

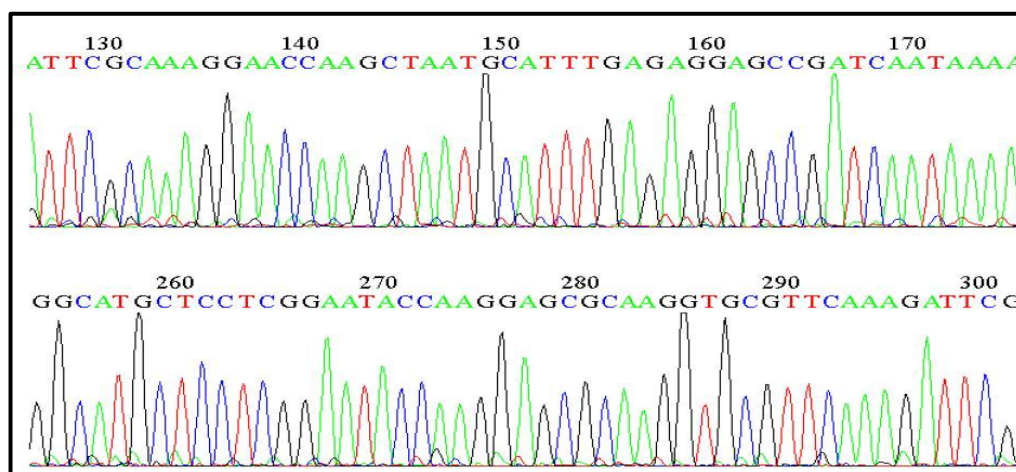


Figure 5 : Exemple de chromatogramme d'une séquence d'ITS4myc.

2.5. BLASTn

Un tableau récapitulant les résultats de BLASTn est présenté en Annexe 1.

Pour 2 souches de *Ganoderma spp.* GC1 *G. lucidum* et GC5 *G. australe* nous observons une homologie supérieure à 97% avec des espèces homologues.

Pour 13 séquences de *Ganoderma sp.* de Tanah Gambus (GPH 1 à GPH Ech2 G4), 4 séquences correspondent à des séquences de *Ganoderma sp.* (1) ou de *Ganoderma lucidum* (3) déjà connues.

Pour 9 échantillons, nous avons amplifiés des Ascomycètes (*Meyerozyma*, *Galactomyces*, *Arxula*, *Candida*, *Rhizomucor*). Les résultats indiquent la présence de levures dans les échantillons. Ceci est dû au mode de transport et de conservation des échantillons. Les levures identifiées ne doivent pas intervenir dans la pathologie et l'expression des symptômes sur palmier.

Pour 4 échantillons de *Fusarium* (Fus X et F 004), les souches Fus R.S.-3-3 et F004 à une séquence avec un ITS homologue à 99% d'une souche décrite comme *Fusarium oxysporum*.

Les 3 souches de *Ganoderma* spp. de référence ont présenté des résultats hétérogènes. La séquence de *G. weberianum* a produit un résultat de BLASTn proche de *Ganoderma weberianum* avec 99% d'homologie. La séquence la plus proche de *G. ahjiinii* dans la banque de données NCBI est à 89% une séquence de *G. weberianum*. Cela s'explique par l'absence de séquence de référence pour cette espèce dans GenBank.

La séquence de NJ3, identifié morpho-anatomiquement comme *G. boninense*, correspond bien à 95% à *G. boninense*.

Figure 6 : Résultats de BLASTn en utilisant la séquence obtenue expérimentalement du *Ganoderma weberianum* de référence du CBS. La plus haute valeur d'homologie de séquence est donnée pour l'échantillon de numéro d'accèsion AY569451 défini comme *Ganoderma weberianum*. Le ratio d'homologie de séquence est de 589/593 paires de bases, soit un pourcentage d'homologie de 99%. Il s'agit ici d'un cas de forte homologie de séquence qui apporte un élément supplémentaire pour confirmer l'appartenance de cette souche de référence du CBS à l'espèce *G. weberianum*.

<p>> _GAI356338741GRIAX569451.1 Ganoderma weberianum isolate SUT H2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=772</p>		
<p>Score = 1052 bits (1166), Expect = 0.0 (0%) Identical = 589/593 (99%) Strand=Plus/Minus</p>		
Query	17	ACCTGATTGAGGTCAGAGGTCATAAATTTGTCCAAACAAGGACGGTTAGAAGCTCGCCA 76
Sbjct	748	ACCTGATTGAGGTCAGAGGTCATAAATTTGTCCAAACAAGGACGGTTAGAAGCTCGCCA 689
Query	77	AAACGCTTCACGGTCGCGGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGATCA 136
Sbjct	688	AAACGCTTCACGGTCGCGGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGATCA 629
Query	137	AGCTAATGCAATTTAAGAGGAGCCGACCGAAACACGCGCCGACAGGCTCCCAAGTCCAGGCC 196
Sbjct	628	AGCTAATGCAATTTAAGAGGAGCCGACCGAAACACGCGCCGACAGGCTCCCAAGTCCAGGCC 569
Query	197	TACAAAAACCCGAAAGGTCCTTAAGTTGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC 256
Sbjct	568	TACAAAAACCCGAAAGGTCCTTAAGTTGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCC 509
Query	257	TCGGAAATACCAAGGAGCGCAAGGTCGCTTCAGAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAA 316
Sbjct	508	TCGGAAATACCAAGGAGCGCAAGGTCGCTTCAGAGATTTCGATGATTCACTGAATTCGCAA 449
Query	317	TTCACTTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAGAGATCCGT 376
Sbjct	448	TTCACTTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAGAGATCCGT 389
Query	377	TGCTGAAAGTTTGTATATAGATCGGTTACATCCCAATACACATTCTAATACCTTTATAGAGT 436
Sbjct	388	TGCTGAAAGTTTGTATATAGATCGGTTACATCCCAATACACATTCTAATACCTTTATAGAGT 329
Query	437	TTGTGATAAACCGCAGGCACAGACGCCCGCTCTACAAGCTCGGTAAAGAGAGCTCGCTTTACG 496
Sbjct	328	TTGTGATAAACCGCAGGCACAGACGCCCGCTCTACAAGCTCGGTAAAGAGAGCTCGCTTTACG 269
Query	497	ACGTTTGAACCCACAGTAAAGTGCACAGGTTAGAGTGGATGAGCAGGCGCTGCACATGC 556
Sbjct	268	ACGTTTGAACCCACAGTAAAGTGCACAGGTTAGAGTGGATGAGCAGGCGCTGCACATGC 209
Query	557	CTCGGAAGGCCAGCTACAACCCAGTCAAAACTCGATAATGATCCTTCCGCAAG 609
Sbjct	208	CTCGGAAGGCCAGCTACAACCCAGTCAAAACTCGATAATGATCCTTCCGCAAG 186

2.6. Discussion et Conclusion

PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

Les résultats obtenus en PCR suggèrent que la méthode est bien adaptée pour l'étude des champignons. Toutefois, nous pouvons remarquer plusieurs problèmes, que nous pensons liés à la nature de nos échantillons et à la technique de récolte et de conservation. En effet, les

échantillons de l'Herbier présentent une amplification très faible, que l'on soupçonne être due à la dégradation au cours du temps. De même, 16 des 18 échantillons de Tanah Gambus (Indonésie) présentent des amplifications multiples, ce qui laisse supposer une contamination de nos échantillons. Les carpophores ont été récoltés et congelés à -80°C en l'état, c'est-à-dire qu'ils présentaient des contaminants multiples sur leur surface (mousses, lichens, fragments de bois, moisissures, insectes, etc.). De plus, lors du transport de ces échantillons vers la France, ils ont très probablement été sujets à une décongélation partielle qui a pu être la source de l'apparition de nouveaux contaminants. Malgré les précautions prises lors de la préparation des échantillons et du broyage (nettoyage à l'eau, prélèvement de tissus internes), il semble que nous soyons toujours en présence de contaminations. Il convient donc d'optimiser la méthode de collecte et de conservation des carpophores afin d'éviter ces problèmes. En ce qui concerne les échantillons des souches en culture sur boîte de Pétri (*Fusarium* et *Ganoderma* de référence), qui présentent un taux de réussite de l'amplification de 100%, nous pouvons supposer que la méthode de collecte et de conservation des échantillons est adaptée pour leur exploitation en biologie moléculaire. Pour les échantillons chez lesquels l'amplification a été un échec (aucune bande observable), nous considérons soit que l'extraction d'ADN a échoué, soit que la présence de contaminants (polysaccharides, sels) a inhibé la réaction enzymatique. Il conviendra alors de réaliser une dilution au 1/100^{ème} de nos matrices d'ADN préalablement quantifiées afin de vérifier cette dernière hypothèse.

BLAST_n

L'analyse par BLAST_n a permis d'obtenir une homologie avec une famille ou un genre ou une espèce. Ces résultats restent toutefois indicatifs et les ratios d'homologie de séquences en termes de nombre de paires de bases similaires doivent être soigneusement pris en compte afin de définir la pertinence de ces résultats. Toutefois, le BLAST_n constitue un complément utile aux méthodes classiques de description des champignons.

3. Etude phylogénétique du genre *Ganoderma boninense*.

3.1. Construction d'arbre phylogénétique.

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec les séquences des échantillons de l'étude et les séquences de référence extraites de NCBI après avoir effectué les BLAST_n. Les deux méthodes choisies pour les comparaisons de nos séquences sont les suivantes :

- La méthode basée sur les distances entre isolats. Les résultats sous forme de matrice carrée correspondent à toutes les comparaisons possibles par paire de taxa. Cette matrice traitée par le programme Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987) donne un arbre optimisant les longueurs des branches.
- La méthode de parcimonie qui examine tous les sites variables pour un ensemble de séquences alignées et construit un arbre (ou des arbres) où les séquences sont placées de telle manière que le nombre total de substitution, site par site, soit minimum dans l'ensemble de l'arbre. Cette méthode est appliquée surtout pour traiter des séquences assez proches (supérieur à 85% d'homologie).

Les séquences de référence sont intégrées dans les alignements et jouent alors le rôle de référence ou point de comparaison. La méthode employée pour vérifier la robustesse des nœuds est la méthode de bootstrap (Felsenstein, 1995) calculée à l'aide du groupe de programmes PHYLIP (*Phylogeny inference package* ; 1995).

Nous avons positionné la racine potentielle avec un groupe externe (ou «outgroup») de Ascomycètes : *Fusarium* sp..

La Figure 7 présente un arbre phylogénétique qui inclut les 12 séquences obtenues expérimentalement ayant donné un résultat d'homologie positif par BLASTn avec des séquences du même genre et/ou espèce et/ou famille pour les genres *Ganoderma* et *Fusarium*, et pour la famille des *Boletaceae*. Nous observons un premier groupe formé par *Ganoderma webernarium* et *Ganoderma ahjiinii* provenant d'Europe. Un deuxième groupe rassemble deux échantillons de *Ganoderma* de Tanah Gambus, Indonésie. Nous observons un troisième groupe, ici formé par un *Ganoderma australe* et un *Ganoderma sp.* de Nouvelle-Calédonie. Enfin, un quatrième groupe regroupant les 3 *Boletus sp.* est observé.

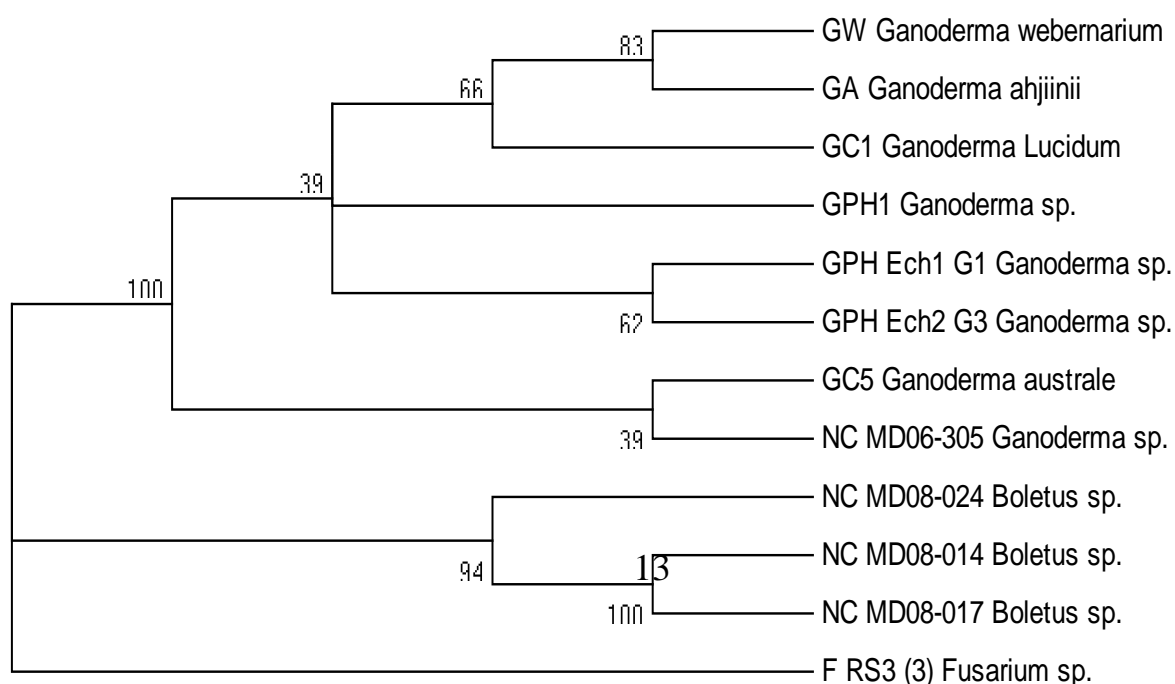


Figure 7 : Arbre phylogénétique des 12 séquences obtenues expérimentalement ayant donné un résultat d'homologie positif par BLASTn avec des séquences du même genre et/ou espèce et/ou famille pour *Ganoderma*, *Fusarium* et les *Boletaceae*. Arbre construit par « neighbor-joining », « maximum composite likelihood », bootstrap replications = 1000.

3.2. Discussions et Conclusion

L'arbre, présenté en Figure 7, a été construit en utilisant uniquement les séquences obtenues expérimentalement pour nos échantillons de *Ganoderma*, pour lesquelles les résultats des BLASTn ainsi que l'arbre présenté en Figure 7 ont permis de confirmer qu'elles correspondaient bien à des séquences de *Ganoderma*. L'enracinement à quant à lui été réalisé avec le *Fusarium* F RS3 (3) préalablement identifié comme un *Fusarium oxysporum* (Annexe 1), ce qui illustre dans ce cas précis l'utilité de la confirmation de l'identification du genre et/ou de l'espèce par BLASTn. Nous pouvons observer des homologies entre des échantillons de la même aire géographique (GPH Ech1 G1 et GPH Ech2 G3), mais également entre des échantillons provenant de deux continents différents (GC5 et NC MD06-305).

II. Etude de faisabilité: Utilisation de la DHPLC pour la caractérisation de *Ganoderma boninense* .

Introduction

Rappelons qu'il est généralement admis que seuls 1 à 10% des microorganismes sont cultivables (Hawksworth et Rossman, 1997). C'est pourquoi, l'étude des communautés fongiques du bois a également été réalisée par amplification de la région ITS par PCR. Les produits d'amplification obtenus ont ensuite été séparés par D-HPLC (Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes). Les pics obtenus en DHPLC ont été récoltés afin d'être séquencés. Le séquençage des collectes a permis d'attribuer un nom d'espèce aux pics par comparaison aux bases de données nucléotidiques.

Hawksworth DL, Rossman AY. 1997. Where Are All the Undescribed Fungi? Phytopathology. 87:888

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Matériel biologique : les caractéristiques biologiques des 32 échantillons étudiés figurent dans l'annexe 4.

Une Souche pure sert de témoin: *Ganoderma lucidum* (souchothèque de Bretagne LMSA 1. 10 701)

Echantillons étudiés : 2, 3, 4, 6, 7, 17, 18, 19, 22, 28, 9A, 9B, 9C, D13, D14, D15, D17, D18, D19, D21, D22, D23, D25, D27, D28, DIVIIBLOCK38, DIVIIBLOCK39, DIVIIBLOCK53, J, NJ, NJ13, NJ63

2.1.2. Extraction d'ADN :

L'extraction d'acides nucléiques est réalisée à l'aide du kit FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals) selon les recommandations du fournisseur. Au final, l'ADN est repris dans 10 µl de tampon Tris 100 mM, pH 8. La quantification de l'ADN se fait par mesure d'absorption à 260 nm.

2.1.3. Amplification d'ADN fongique : Les amorces utilisées sont les amorces, ITS1 et ITS2, qui encadrent la zone d'ADN comportant la zone ITS1. Leurs séquences sont les suivantes : ITS 1 : 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' et ITS 2 : 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'.

Le volume du mélange réactionnel d'amplification est de 50 µl. Il comprend 20 ng d'ADN, 0,3 µM de chaque amorce « Reverse » et « Forward », 0,2 mM de dNTP, 1X de tampon (GoTaq

Flexi Buffer, Promega), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,5 U de *Taq* (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega) et est complété à 50 µl avec de l'eau distillée.

L'amplification se fait sur un appareil PCR (modèle PTC-100, MJ Research, Inc.) et suivant le programme : 5 min-94°C, 30 fois [94°C-1 min, 62°C-1 min, 72°C-1 min], 72°C-5 min.

Les produits d'amplification (5 µl) sont déposés sur un gel d'agarose 1% réalisé dans du TBE 1X (Tris-borate 0,09 M, 0,002 M EDTA). 5 µl de marqueur de taille (BenchTop 100 bp DNA Ladder, Promega) sont déposés sur le gel. Après migration dans du tampon TBE 1X à 70 volts, le gel est coloré dans un bain de bromure d'éthidium et observé sous ultra-violets.

2.1.4. Analyse des produits d'amplification par DHPLC

Tous les échantillons d'ADN ont été analysés par D-HPLC (Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes).

La D-HPLC est une application de la méthode chromatographique classique (HPLC) à la séparation de l'ADN. L'ADN est introduit dans la colonne thermorégulée. Les variations de la température appliquée à la colonne permettent de travailler en conditions dénaturantes ou non dénaturantes. La phase stationnaire électriquement neutre et hydrophobe est composée de particules alkylées non poreuses (styrène/divinylbenzène). Le TEAA est amphiphile, il s'adsorbe donc à la surface de la phase stationnaire, présentant ainsi une charge positive à sa surface. Ces particules vont attirer et fixer l'ADN chargé négativement. Son élution est réalisée en faisant passer un gradient linéaire et croissant d'acétonitrile. Un détecteur UV couplé à la machine lit les signaux en sortie de colonne.

Pour l'analyse de nos produits PCR, 5µL sont injectés dans la colonne à une température dénaturante de 50°C et un débit de 0,5mL/min pour la circulation des solvants. Le tampon A est composé de 0.1 M TEAA et le tampon B de 0.1 M TEAA et de 25% d'acétonitrile (phase mobile).



Figure 8 : L'appareil utilisé : Wave® System (Transgenomic)

L'appareil utilisé est un Wave® System (Transgenomic). Ce système utilise une colonne de séparation DNasep®. Les processus d'injection puis de séparation des molécules d'ADN en fonction du gradient d'élution sont automatisés grâce au logiciel Navigator™ software (Transgenomic). Une fois par semaine, il est nécessaire d'injecter des standards de taille (5µl) propres au système afin d'assurer la fiabilité des résultats. Ils permettent de vérifier : la résolution de la colonne ainsi que la calibration du four (marqueurs Wave Low Range Mutation Standard et Wave High Range Mutation Standard) et sa capacité à séparer les fragments en fonction de leur taille (marqueur Wave DNA Sizing Control).

Des lavages réguliers de la colonne avec de l'acétonitrile viennent compléter cet entretien.

Le volume d'injection des échantillons est de 5µl de volume d'amplification pour les souches pures et les échantillons environnementaux.

Pour chaque injection de produit d'amplification, une méthode est définie. Elle fixe un gradient de température, de solvant et un temps d'élution.

2.1.5. Traitement des données et analyse des séquences

Les séquences sens et antisens obtenues sont nettoyées et alignées selon l'algorithme Clustal W (paramètres par défaut du logiciel Mega 5) (Tamura et al., 2011). Après obtention d'une séquence consensus (contig) avec le logiciel (Seaview, Version 4.3.5), nous confrontons les séquences obtenues aux bases de données nucléotide (nt) du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Le résultat du BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) permet de retrouver rapidement dans des bases de données, les séquences ayant des zones de similitude avec une séquence donnée. En fonction des critères de qualité de l'alignement (e-value, maximum d'identité, % de couverture, ...), le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé sur les dix premiers résultats issus du BLAST. Nous complétons cette analyse par un nouvel alignement des séquences consensus et des séquences obtenues à l'aide du BLAST pour réaliser un arbre phylogénétique par la méthode du Neighbour-Joining. Ainsi, nous pouvons déterminer pour la séquence obtenue, le nom exact en vigueur dans la nomenclature et la classification des différents phylums qui composent la phylogénie du règne fongique.

2.2. Résultats

2.2.1 Amplifications :

Les échantillons codés DIVIIBLOCK38, DIVIIBLOCK39, DIVIIBLOCK53 sont notés B38, B39 et B53 respectivement. Le produit d'amplification de 5 autres échantillons D13, NJ13, D27, D28 et D25 ne figurent pas sur ces gels mais ont été amplifiés également.

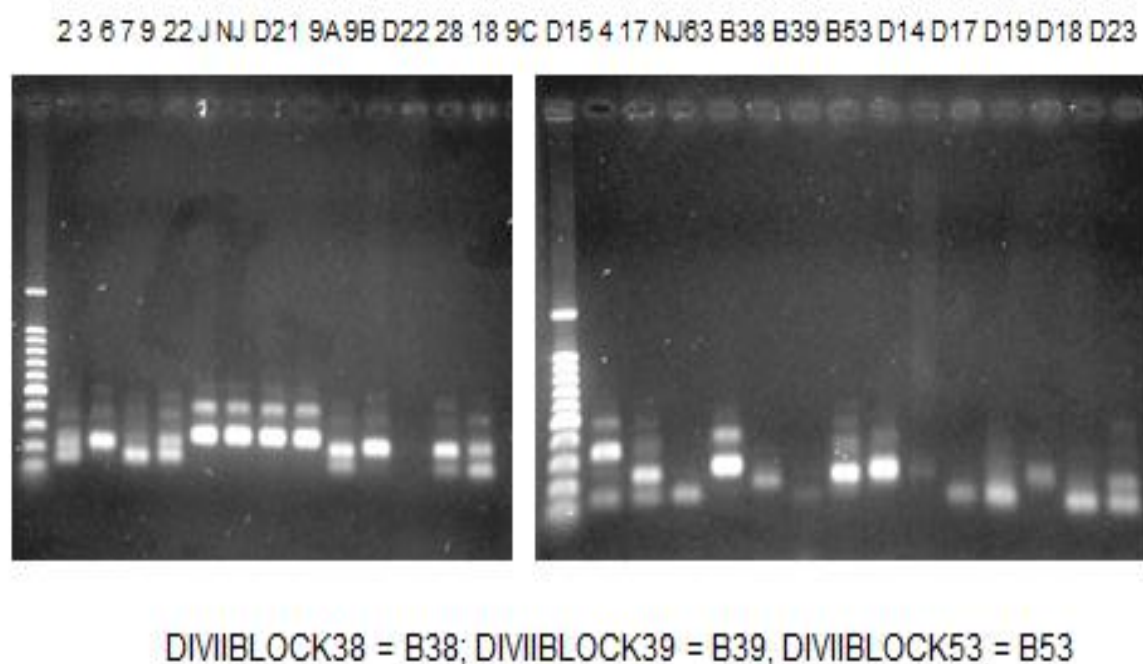
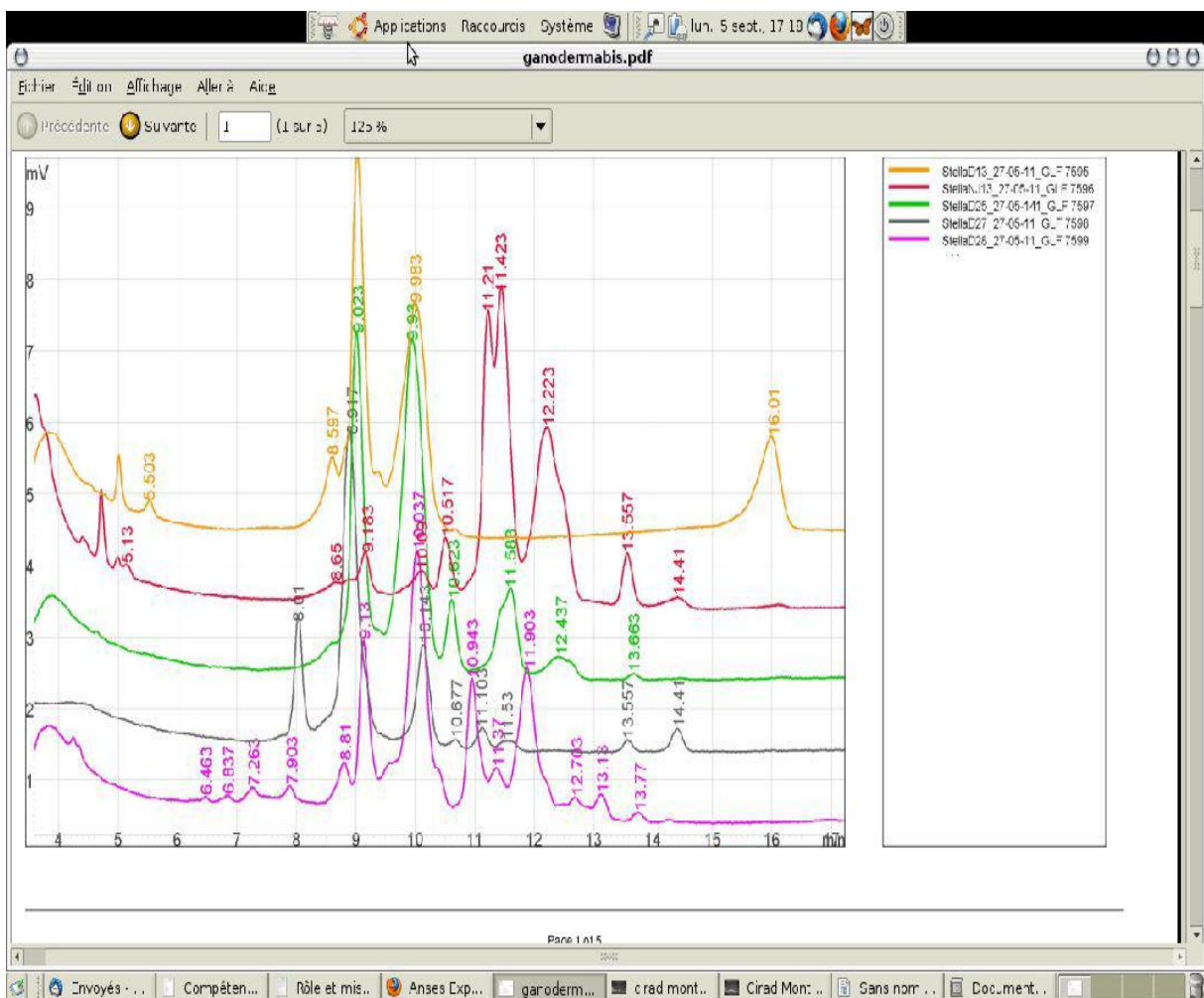
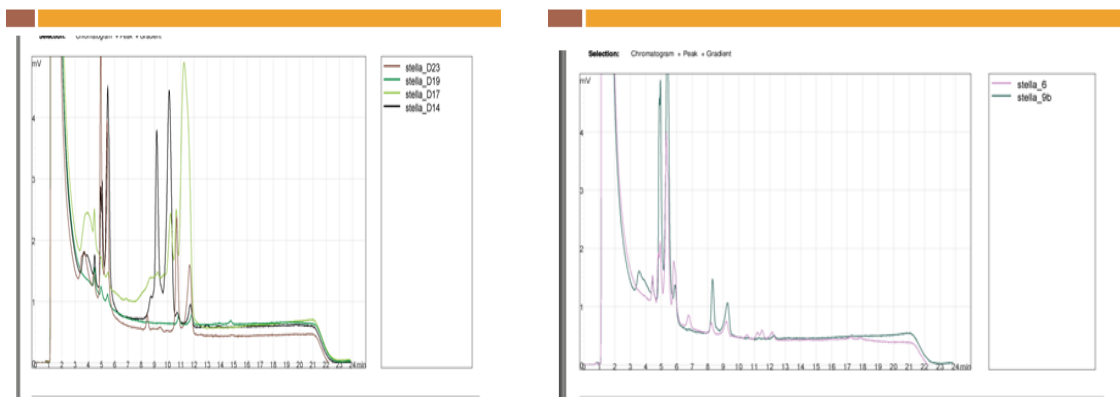


Figure 9 : photographies des gels de migration des produits d'amplification obtenus pour les échantillons

De multiples bandes sont observées pour la plupart des échantillons. Ceci s'explique par le fait que nous avons des échantillons environnementaux et l'emploi d'amorces universelles. Ainsi, il apparaît que nous avons plusieurs micro-organismes appartenant au règne des champignons pour chacun des échantillons.

2.2.2. Séparation des produits d'amplification par DHPLC

L'analyse en DHPLC confirme bien les observations des gels de migration et la présence de plusieurs amplicons (et donc espèces) par échantillons. L'analyse d'une souche pure de *Ganoderma lucidum* dans les mêmes conditions d'amplification montre cependant la présence de 2 pics pour cette espèce (figure 10). Il est probable que certains pics soient dédoublés et correspondent à la même espèce.



Sample Name	Project	Trey	Vial	Application Type	Method Name	Temp	%B	Shift	Vol	BP	Dye	Mutation Call	ID	Inj. Run Date
Stella027_27-05-11_GLF 7598	GLF2010	FC_Cirad_3	23	Mutation Detection	GLF	50	28.8	0	5	200			7598	2011-05-27 13:35:01.0

UV TRACE	Peak #	Retention	Peak Start	Peak End	Peak Height	Peak Area	Percent Area	Peak FWHM	BP Est.
	1	8.01	7.477	8.277	1.619	20114.939	13.299	0.255	147*
	2	8.917	8.277	9.61	4.271	91480.047	60.484	0.251	153*
	3	10.143	9.61	10.463	1.397	24478.363	16.184	0.284	161*
	4	10.677	10.463	10.837	0.104	1209.941	0.8	0.246	164*
	5	11.103	10.837	11.317	0.287	3467.031	2.292	0.219	167*
	6	11.53	11.317	11.583	0.113	1294.169	0.856	0	170*
	7	13.557	13.387	13.93	0.181	2670.658	1.766	0.222	186*
	8	14.41	13.93	14.677	0.365	6532.721	4.319	0.291	194*

Gradient	Stop	Time	%A	%B	%C	%D
Loading	0	55	45			
Start Gradient	0.1	48	52			
Stop Gradient	18.1	39	61			
Start Clean	18.2	55	45		0	
Stop Clean	18.7	55	45		0	
Start Equilibrate	18.8	55	45			
Stop Equilibrate	20.3	55	45			

Sample Name	Project	Trey	Vial	Application Type	Method Name	Temp	%B	Shift	Vol	BP	Dye	Mutation Call	ID	Inj. Run Date
Stella026_27-05-11_GLF 7599	GLF2010	FC_Cirad_3	24	Mutation Detection	GLF	50	28.8	0	5	200			7599	2011-05-27 13:59:42.0

UV TRACE	Peak #	Retention	Peak Start	Peak End	Peak Height	Peak Area	Percent Area	Peak FWHM	BP Est.
	1	6.463	6.357	6.623	0.067	488.851	0.199	0.097	138*
	2	6.837	6.623	6.987	0.099	1127.012	0.458	0.14	142*
	3	7.263	6.987	7.53	0.223	3962.417	1.612	0	143*
	4	7.903	7.53	8.277	0.259	5501.928	2.238	0.182	148*
	5	8.81	8.277	8.917	0.627	9873.68	4.016	0	152*
	6	9.13	8.917	9.387	2.301	31818.252	12.942	0.226	154*
	7	10.037	9.387	10.623	3.607	93494.273	38.028	0.313	160*
	8	10.943	10.623	11.21	1.841	28376.637	11.542	0.195	166*
	9	11.37	11.21	11.53	0.642	10355.139	4.212	0	169*
	10	11.903	11.53	12.437	2.016	48967.388	19.917	0.301	173*
	11	12.703	12.437	12.863	0.272	5324.26	2.166	0	179*
	12	13.13	12.863	13.45	0.336	5463.062	2.222	0.185	183*
	13	13.77	13.45	13.93	0.105	1100.538	0.448	0.234	188*

Figure 10 : Exemples de profils de communautés microbiennes obtenus en DHPLC. Ces profils montrent des différences qualitatives et quantitatives entre les échantillons. Afin d'attribuer des noms d'espèces à chacun de ces pics, le séquençage des fractions collectées puis le BLASTn sont effectués.

2.2.3. Identification des pics obtenus en DHPLC par séquençage

Les pics obtenus en DHPLC pour les échantillons positifs ont été collectés et séquencés afin d'attribuer un nom d'espèce aux produits d'amplification. Les séquences obtenues figurent en annexes 5 et 6.

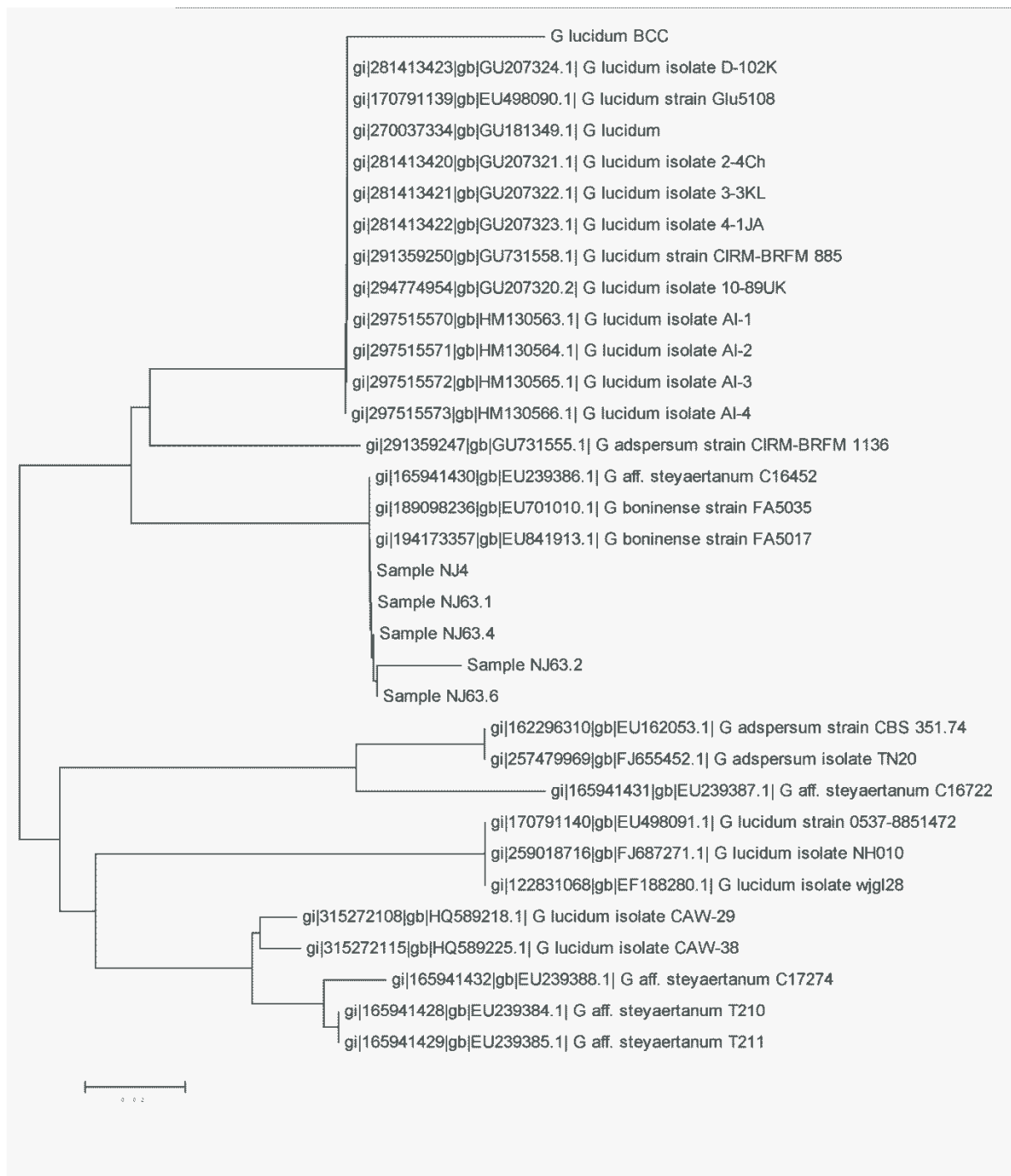
Puis une fois les séquences obtenues, les comparaisons de séquence sont réalisées avec les séquences de GENBANK. Les meilleurs résultats du BLAST figurent dans l'annexe 4.

Les résultats indiquent la présence de levures dans les échantillons. Ceci est dû au mode de transport et de conservation des échantillons. Les levures identifiées ne doivent pas intervenir dans la pathologie et l'expression des symptômes sur palmier.

Un arbre phylogénétique est construit par « neighbor-joining » avec les 5 séquences obtenues expérimentalement ayant donné un résultat d'homologie positif par BLASTn avec des séquences du même genre et/ou espèce et/ou famille pour *Ganoderma boninense* (Figure 11). Ces résultats de séquençage montrent que *Ganoderma boninense* a été identifié dans les échantillons NJ4 et NJ63. *Ganoderma boninense* issues des plantations de Tanah Gambus se

sont placées parfaitement dans le groupe des *Ganoderma boninense*.

Figure 11 : Arbre construit par « neighbor-joining »



Références bibliographiques

- [1] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW et Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- [2] Blackwell M (2011) The *Fungi*: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98, In press.
- [3] Bridge P et Spooner B (2001) Soil *Fungi*: diversity and detection. *Plant and Soil*, 232, 147-154.
- [4] Brundrett M (1991) Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 21, 171-313.
- [5] Bruns, TD, Vilgalys R, Barns SM, Gonzalez D, Hibbett DS, Lane DJ, Simon L, Stickel S, Szaro TM, Weisburg WG et Sogin ML (1992) Evolutionary relationships within the *Fungi*: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 9, 231-241.
- [6] Crawford DL et Crawford RL (1980) Microbial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 11-22.
- [7] Fougereuse M (1976) Rappels de mycologie générale et de systématique mycologique. 54p.
- [8] Gardes M et Bruns TD (1993) ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of *Mycorrhizae* and Rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118.
- [9] Grandcolas P, Murienne J, Robillard T, Desutter-Grandcolas L, Jourdan H, Guilbert E et Deharveng L (2008) New Caledonia: A very old Darwinian island? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 3309-3317.
- [10] Grube M, Depriest PT, Gargas A et Hafellner J (1995) DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research*, 99, 1321-1324.
- [11] Hibbett DS, Binder M *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- [12] Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P et Nilsson RH (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in *Fungi* and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25, 38-47.
- [13] Jaffré T, Morat P, Veillon JM, Rigault F et Dagostini G (2001) Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-Calédonie. Documents Scientifiques et Techniques vol. II 4. Edition IRD de Nouméa.
- [14] Jourand P, Ducousso M, Reid R, Majorel C, Richert C, Riss J et Lebrun M (2010) Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. *Tree Physiology*, 30, 1311-1319.
- [15] Jourand P, Ducousso M, Loulerque-Majorel C, Hannibal L, Santoni S, Prin Y et Lebrun M (2010) Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. *FEMS Microbiology Ecology*, 72, 238-249.
- [16] Kuck PH (2012) U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/nickel/mcs-2012-nicke.pdf>

- [17] Le Quéré A, Johansson T, Tunlid A (2002) Size and complexity of the nuclear genome of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 234 – 241.
- [18] Lutzoni F, Kauff F *et al.* (2004) Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, 91, 1446-1480.
- [19] Majorel C, Hannibal L, Soupe ME, Carriconde F, Ducousso M, Lebrun M et Jourand P (2012) Tracking nickel-adaptative biomarkers in *Pisolithus albus* from New Caledonia using a transcriptomic approach. *Molecular Ecology*, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05527.x
- [20] Moreau PA, Daillant O, Corriol G, Gueidan C et Courtecuisse R (2002) Renecofor – Inventaire des champignons supérieurs et des lichens sur 12 placettes du réseau et dans un site atelier de l'INRA/GIP ECOFOR – Résultats d'un projet pilote (1996-1998). Office National des Forêts, Fontainebleau, 142p.
- [21] Mueller G et Schmit J (2007) Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16, 1-5.
- [22] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB et Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- [23] Perrier N, Ambrosi JP, Colin F et Gilkes RJ (2006) Biogeochemistry of a regolith: The New Caledonian Koniombo ultramafic massif. *Journal of Geochemical Exploration*, 88, 54-58.
- [24] Prin Y, Ducousso M, Tassin J, Béna G, Jourand P, Dumontet V, Moulin L, Contesto C, Ambrosi JP, Chaintreuil C, Dreyfus B et Lebrun M (2012) Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ultramafic forest ecosystems of New Caledonia. *Sous presse*.
- [25] Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS et Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in *Fungi*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 21–32.
- [26] Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A et Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396, 69-72.
- [27] Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH et Wall DH (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304, 1629-1633.
- [28] White TJ, Bruns T, Lee S et Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, 315-322.
- [29] Zaremski A, Prin Y, Ducousso M et Fouquet D (1998) Caractérisation moléculaire des champignons lignivores. Utilisation d'une nouvelle technique. *Bois et Forêts des Tropiques*, 257, 63-69.
- [30] Zaremski A, Ducousso M, Domergue O, Fardoux J, Rangin C, Fouquet D, Joly H, Sales C, Dreyfus B et Prin Y (2005) In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot Basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, 1256-1260.

ANNEXES

Annexe 1 : Principales caractéristiques des 61 échantillons étudiés : numéro de référence identification morpho-anatomique et origine

N°	Ref CIRAD	Nom de la souche LABO	Origine géographique	Identité Blast-longueur de séquence et %			N° accession GENBANK	Identité Blast-longueur de séquence et %			N° accession GENBANK
				Identification Blastn , ITS4	longueur	%		Identification Blast, ITS1	longueur	%	
1	GHC 1	<i>Ganoderma lucidum</i> (Leyss et Fr.) Karst. ou <i>fornicatum</i> (Fr.) Pat.	Guyane Piste d'Elie (1982) - Sur Wafa		x	x	x	x	x	x	x
2	GHC 2	<i>Ganoderma ericetorum</i>	Guyane (1982) Chantir SE - Isol 1352	x	x	x	x	x	x	x	x
3	GHC 4 (3 18C)	<i>Ganoderma</i> sp.	Guyane - Orstom (1976) - En mycothèque	x	x	x	x	x	x	x	x
4	GHC 5	<i>Ganoderma testaceum</i> (lèv)	Guyane Piste St Elie (1982) - Bille au sol	x	x	x	x	x	x	x	x
5	GC1	<i>JMIB - Ganoderma lucidum</i>	Bellême (61)	<i>Ganoderma Lucidum</i>	563/581	97	JN222422	x	x	x	x
6	GC2	<i>Ganoderma pfeifferi</i> <i>Bresadola</i>	Bellême (61)	x	x	x	x	x	x	x	x
7	GC3	<i>Ganoderma lipsiense</i> (Batsch) G.F. Atkinson	ORIVAL (14) près de Creully	x	x	x	x	x	x	x	x
8	GC4	<i>Ganoderma lucidum</i> (W. Curtis : Fr.) P. Karsten	Grimbosq (14)	x	x	x	x	x	x	x	x
9	GC5	<i>Ganoderma australe</i> (Fr. : Fr.) Patouillard	Cerisy (14) sur Fagus	<i>Ganoderma australe</i>	380/386	98	FR686555	<i>Ganoderma australe</i>	396/445	89	FR686555
10	GPH 1	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma</i> sp.	579/615	94	JN400509	<i>Ganoderma</i> sp.	48/57	84	JN400515
11	GPH 5	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	x	x	x	x	<i>Galactomyces reessii</i>	121/138	88	HQ436459
12	GPH 8	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	x	x	x	x	x	x	x	x
13	GPH 12	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	x	x	x	x	<i>Geotrichum</i> sp.	286/300	95	AY787702
14	GPH 13	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Meyerozyma</i> sp.	444/557	80	JN255456	x	x	x	x
15	GPH 15	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	x	x	x	x	<i>Galactomyces candidum</i>	101/125	81	JN974288
16	GPH 16	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma lucidum</i>	206/221	93	JQ040846	x	x	x	x
17	GPH 20	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	103/118	87	EF159152	<i>Galactomyces geotrichum</i>	163/202	81	HQ436461
18	GPH 23	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	x	x	x	x	<i>Galactomyces geotrichum</i>	305/309	99	HM210837
19	GPH 24	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	322/340	95	HM047769	x	x	x	x
20	GPH 25	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	306/329	93	HM051079	<i>Geotrichum</i> sp.	180/184	98	AB727649
21	GPH 26	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	315/333	95	HM047769	<i>Galactomyces</i> sp.	226/250	90	DQ667968
22	GPH 27	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Rhizomucor variabilis</i>	93/108	86	JQ885450	<i>Marasmius epiphyllus</i>	90/117	77	JN943602
23	GPH 28	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	251/283	89	GQ458034	<i>Galactomyces geotrichum</i>	294/315	93	JN226397
24	GPH Ech1 G1	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma lucidum</i>	543/604	90	HM053463	<i>Ganoderma lucidum</i>	377/432	87	HM053465
25	GPH Ech1 G2	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Arxula adenivorans</i>	147/158	93	FJ713087	x	x	x	x
26	GPH Ech1 G3	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma lucidum</i>	570/602	95	HM053463	x	x	x	x
27	GPH Ech2 G4	<i>Ganoderma</i> sp.	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Candida parapsilosis</i>	321/333	96	JQ697540	x	x	x	x
28	NC MD06- 022	<i>Ganoderma</i> sp.	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	x	x	x	x	x	x	x	x
29	NC MD06- 022 bis	<i>Ganoderma</i> sp.	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	<i>Lentinus</i> sp.	559/595	94	GQ849478	x	x	x	x

30	NC MD06- 118	<i>Coltricia sp.</i>	Ouen Toro, Nouvelle-Calédonie	<i>Ganoderma sp.</i>	573/588	97	AJ536664	<i>Amauroderma rugosum</i>	400/460	87	HM480835
31	NC MD06- 159	<i>Indéterminé</i>	« Sunrise Bungalow », îles de Tanna, Vanuatu	<i>Ganoderma sp.</i>	501/585	86	AJ536664	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
32	NC MD06- 169	<i>Ganoderma lucidum</i>	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	<i>Galactomyces geotrichum</i>	204/243	84	DQ680681	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
33	NC MD06- 305	<i>Ganoderma sp.</i>	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	<i>Ganoderma lucidum</i>	200/289	69	JN222425	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
34	NC MD08- 002	<i>Ganoderma lucidum</i>	Pi du grand Kaori, Nouvelle-Calédonie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
35	GW	<i>Ganoderma weberianum</i>	CIRAD Mycothèque	<i>Ganoderma weberianum</i>	589/593	99	AY569451	<i>Ganoderma weberianum</i>	404/436	93	AY569451
36	GA	<i>Ganoderma ahjiinii</i>	CIRAD Mycothèque	<i>Ganoderma webernarium</i>	541/605	89	AY569451	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
37	NC MD06- 022	<i>Ganoderma sp.</i>	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
38	NC MD06- 169	<i>Ganoderma lucidum</i>	Koniambo, Nouvelle-Calédonie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
39	NC MD06- 365	<i>Grifola sp.</i>	Confiance (Koniambo) , Nouvelle-Calédonie	<i>Ganoderma sp.</i>	50/55	91	JN400515	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
40	NC MD08- 002	<i>Ganoderma lucidum</i>	Pi du grand Kaori, Nouvelle-Calédonie	<i>Umbelopsis isabellina</i>	98/107	92	HQ630365	<i>Mortierella sp.</i>	75/86	87	GU394600
41	NJ3	<i>Ganoderma boninense</i>	CIRAD Mycothèque	<i>Ganoderma sp.</i>	482/525	92	JN400513	<i>Ganoderma boninense</i>	184/194	95	EU841913
42	NJ3 bis	<i>Ganoderma boninense anthony</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	473/498	95	JN400513	<i>Ganoderma aff. Steyaertanum</i>	449/457	98	EU239386
43	GI2	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	428/480	89	JN400513	<i>Ganoderma sp.</i>	349/370	94	JN400513
44	GI3	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	444/473	94	JN400513	<i>Ganoderma sp.</i>	441/452	98	JN400511
45	GI4	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	470/495	95	AY220542	<i>Ganoderma sp.</i>	430/455	95	JN400513
46	IA	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	112/128	88	JN400515	<i>Ganoderma sp.</i>	94/100	94	JN400515
47	ID	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	328/338	97	JN400513	<i>Ganoderma sp.</i>	451/468	96	AY220539
48	IJ	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>Ganoderma sp.</i>	400/417	96	JN400511
49	I5	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	276/294	94	JN400513	<i>Ganoderma sp.</i>	446/478	93	JN400513
50	I10	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	160/167	96	JN400515	<i>Ganoderma sp.</i>	277/340	81	JN400511
51	I16	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	116/139	83	AY220543	<i>Ganoderma sp.</i>	408/442	92	JN400513
52	I22	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	107/131	82	AY220542	<i>Ganoderma sp.</i>	367/376	98	AY220542
53	I28	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
54	I30	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	71/90	79	JN400515	<i>Ganoderma sp.</i>	139/169	82	AY220544
55	I31	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	169/175	97	AY220542	<i>Ganoderma sp.</i>	169/178	95	AY220542
56	I34	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>x</i>	<i>Ganoderma sp.</i>	314/401	78	JN400510
57	I45	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	91/100	91	AY220544	<i>Ganoderma sp.</i>	120/143	84	AY220544
58	I51	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	145/170	85	JN400510	<i>Ganoderma sp.</i>	339/393	86	JN450510
59	I54	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	450/467	96	JN400511	<i>Ganoderma sp.</i>	422/444	95	AY220542
60	I56	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	159/165	96	AY220543	<i>Ganoderma sp.</i>	484/515	94	AY220543
61	I9805033	<i>Ganoderma boninense</i>	Tanah Gambus, Sumatra, Indonésie	<i>Ganoderma sp.</i>	355/401	89	AY220542	<i>Ganoderma sp.</i>	404/457	88	JN400513

Annexe 2 :

Annexe 2a : Protocole d'extraction de Le Quéré et al. (2002)

Cent mg de poudre de bois, de carpophore ou de mycélium, sont ajoutés à 1 ml de tampon, préparé le jour même (certains produits comme le β -mercaptoéthanol étant instables dans le temps) dans un tube Eppendorf de 2 ml.

Le tampon contient les produits suivants :

- 100 mM de Tris-HCL (pH 8) avec $C_m = 1\text{ M}$
- 100 mM d'EDTA avec $C_m = 0.5\text{ M}$
- 2% de SDS avec $C_m = 20\%$
- 1% de β -mercaptoéthanol avec $C_m = 98\%$
- 100 μg de protéinase K avec $C_m = 10\text{ mg/ml}$

Les échantillons sont ensuite broyés dans le tampon à l'aide d'un micro pilon, puis vortexés. Le mélange est incubé au bain marie à 55°C pendant 30 minutes, puis 1 heure à 37°C .

250 μL de NaCl à 5 M sont ajoutés, puis 110 μL de cetyltriméthylammonium (CTAB) à 10%. La suspension est vortexée puis incubée 10 minutes au bain marie à 65°C . Chaque tube est ensuite placé dans la glace pendant 30 minutes, puis centrifugé 10 minutes à 6000 rpm.

Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf 1.5 ml, préalablement placé dans la glace, et on ajoute 550 μL d'isopropanol, ce qui a pour effet de faire précipiter l'ADN. On centrifuge à 13200 rpm pendant 20 minutes, puis le surnageant est éliminé.

Le culot contenant l'ADN est lavé en ajoutant 300 μL d'éthanol à 70% et on centrifuge à 13200 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé, en prenant soin de laisser les vapeurs d'alcool s'évaporer sous la hotte.

Enfin, le culot obtenu est dissous dans 50 μL de TE buffer 1X (1 mM d'EDTA, 10 mM de Tris-HCL pH 8). Chaque tube est ensuite placé une nuit à 4°C afin de faciliter la dissolution du culot contenant l'ADN.

Annexe 2b : Procotole d'extraction Invitrogen PureLink Plant Total DNA Purification Kit (optimisations en rouge)

1. Freeze the tissue in liquid nitrogen and grind the tissue to a powder.
2. Add 250 µl (500 µl) Resuspension Buffer (R2) supplied in the kit to the tissue from Step 1 at room temperature.
3. Prepare lysate by homogenizing the soft tissue with a tissue homogenizer or vortexing the ground tissue/lyophilized sample until sample is completely resuspended.
4. Add 15 µl (30 µl) 20% SDS and 15 µl (30 µl) RNase A (20 mg/ml) supplied in the kit to the lysate.
5. Incubate the lysate at 55°C for 15 minutes to complete lysis.
6. Centrifuge the lysate at high speed for 5 minutes to remove insoluble materials.
7. Transfer the clear supernatant to a sterile, 1.5 ml microcentrifuge tube without disturbing the pellet.
8. Add 100 µl (200 µl) Precipitation Buffer (N2) supplied with the kit to the clear lysate. Mix by vortexing and incubate **on ice** for 5 minutes. The proteins and polysaccharides are precipitated and any photosynthetic pigments that are bound to proteins are also removed with this step. The pigments can stain the PureLink™ spin cartridge material that may produce colored eluate.
9. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes at room temperature to produce a clear lysate. **Note:** The supernatant should be clear and not viscous after this precipitation step.
10. Transfer 250 µl clear lysate to a new, sterile microcentrifuge tube and add 375 µl Binding Buffer (B4) with ethanol (previous page) to the lysate. Mix well.

Binding DNA:

1. Remove a PureLink™ Spin Cartridge in a Collection Tube from the package.
2. Add sample with Binding Buffer from Step 10, previous page to the PureLink™ Spin Cartridge.
3. Centrifuge the cartridge at 10,000 × g for 30 seconds at room temperature.
4. Discard the flow through and place the spin cartridge into the Wash Tube supplied with the kit.

Washing DNA:

1. Add 500 µl Wash Buffer (W4) supplied in the kit to the cartridge.
2. Centrifuge the cartridge at 10,000 × g for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the column back into the tube.
3. Add 500 µl Wash Buffer (W5) with ethanol (page 5) to the column.
4. Centrifuge the cartridge at 10,000 × g for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through from the Wash Tube and place the cartridge back into the tube.
5. **Repeat** Steps 3-4 one more time.
6. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 2 minutes at room temperature to remove any residual Wash Buffer (W5). Discard the Wash Tube.

Eluting DNA:

1. Place the spin cartridge in a sterile, DNase-free 1.5-ml microcentrifuge tube.
2. Add 100 µl (50 µl) of distilled water (pH >7.0).
3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the cartridge at maximum speed for 1 minute.

The elution tube contains the purified DNA.

Storing DNA:

Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.

For long-term storage, store the purified DNA in Elution Buffer (E1) at -20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.

To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.

Annexe 3 : Liste des échantillons pour l'étude de la biodiversité de Ganoderma par DHPLC

Numéro de l'arbre	Numéro de l'échantillon	Descriptif de l'échantillon	Date de prélèvement	Origine géographique	Numéro de parcelle	Block	Numéro de rang	Numéro de palmier	Génération	Date de plantation	Age (an)	Symptôme des feuilles
1	1	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	107	16	3	2001	9	Léger
1	2	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	107	16	3	2001	9	Léger
1	3	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	107	16	3	2001	9	Léger
1	4	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	107	16	3	2001	9	Léger
2	5	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	104	20	3	2001	9	Léger
2	6	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	104	20	3	2001	9	Léger
2	7	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	18	104	20	3	2001	9	Léger
3	8	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	54	61	2	3	1999	11	Intermédiaire
3	9a	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	54	61	2	3	1999	11	Intermédiaire
3	9b	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	54	61	2	3	1999	11	Intermédiaire
3	9c	Tissu frais/ mycélium	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	54	61	2	3	1999	11	Intermédiaire
4	10	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	34	5	1	2	1998	12	Léger
4	11	Mélange	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	34	5	1	2	1998	12	Léger
5	12	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	34	8	2	2	1998	12	Léger
6	13	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	23A	25	6	4	1996	14	Léger
7	14	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	54	77	2	4	1999	11	Intermédiaire
8	15	Fructification/ carpophore	27/09/2010	Tanah Gambus	IV	55	53	2	2	1999	11	Léger

9	16	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	IV	24	7	13	3	1990	20	Important
9	17	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	IV	24	7	13	3	1990	20	Léger
10	18	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	IV	24	7	14	3	1990	20	Sain
10	19	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	IV	24	7	14	3	1990	20	Sain
11	20	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	II	27	58	9	4	2005	5	Léger
11	21	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	II	27	58	9	4	2005	5	Léger
11	22	Tissu frais/ mycélium	28/09/2010	Tanah Gambus	II	27	58	9	4	2005	5	Léger
12	23	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	III	41A	20	12	3	1985	25	Léger
13	24	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	III	41A	46	3	3	1985	25	Sain
14	25	Mélange	28/09/2010	Tanah Gambus	III	57	123	7	3	1986	24	Important
15	26	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	III	62	98	12	3	1986	24	Sain
16	27	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	III	65	90	12	3	1988	22	Sain
17	28	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	III	69	66	14	3	1989	22	Sain
Pathologie	29 (nursérie)	Fructification/ carpophore	28/09/2010	Tanah Gambus	Pathologie nurserie							
			NB : Mélange = Fructification/ carpophore + Tissu frais/ mycélium									

Annexe 4

DHPLC : Liste des meilleurs résultats du BLAST obtenus par comparaison de la séquence obtenue aux bases de données pour les autres échantillons :

3.3_JTS1	EU816401.1 <i>Pichia guilliermondii</i> isolate STRPG internal transcribed spacer 1
D14.3	JF920159.1 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain PYSS1 internal transcribed spacer 1
D17.1_JTS1	JF920159.1 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain PYSS1 internal transcribed spacer 1
D17.2_JTS1	EU568999.1 <i>Pichia caribbica</i> isolate CNRMA 200500608 18S ribosomal RNA gene
D17.3_JTS1	EU816401.1 <i>Pichia guilliermondii</i> isolate STRPG internal transcribed spacer 1
D19.2_JTS1	JF920159.1 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain PYSS1 internal transcribed spacer 1
E160_JTS1	JN588577.1 <i>Ganoderma lucidum</i> isolate Glu15 18S ribosomal RNA gene
NJ63.1_JTS1	AY220543.1 <i>Ganoderma</i> sp. MT-1 internal transcribed spacer 1
19.2_JTS1	JN159661.1 <i>Candida tropicalis</i> strain BR internal transcribed spacer 1
22.3_JTS1	EU135909.1 <i>Gastrodia elata</i> isolate TJ37 18S ribosomal RNA gene
4.3_JTS1	EU816401.1 <i>Pichia guilliermondii</i> isolate STRPG internal transcribed spacer 1
J1_JTS1	EU568999.1 <i>Pichia caribbica</i> isolate CNRMA 200500608 18S ribosomal RNA gene
J2_JTS1	JF920159.1 <i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain PYSS1 internal transcribed spacer 1
J5_JTS1	JF901806.1 <i>Candida boldinii</i> 18S ribosomal RNA gene
J6_JTS1	EU135909.1 <i>Gastrodia elata</i> isolate TJ37 18S ribosomal RNA gene
NJ1_JTS1	JN179081.1 <i>Exserohilum rostratum</i> isolate L3 18S ribosomal RNA gene
NJ2_JTS1	JN207314.1 <i>Exserohilum</i> sp. P28E4 18S ribosomal RNA gene
NJ3_JTS1	AB054045.1 <i>Syncephalastrum racemosum</i> genes for 18S rRNA
NJ4_JTS1	AY220540.1 <i>Ganoderma</i> sp. BJ-8 internal transcribed spacer 1

Annexe 5

DHPLC : Alignement de séquence effectué avec les séquences obtenues et les séquences de NCBI en PAUP :

#NEXUS

[Title]

begin taxa;

dimensions ntax=33;

taxlabels

G_lucidum_BCC

gi|122831068|gb|EF188280.1|_G_lucidum_isolate_wjgl28

gi|162296310|gb|EU162053.1|_G_adersum_strain_CBS_351.74

gi|165941428|gb|EU239384.1|_G_aff._steyaertanum_T210

gi|165941429|gb|EU239385.1|_G_aff._steyaertanum_T211

gi|165941430|gb|EU239386.1|_G_aff._steyaertanum_C16452

gi|165941431|gb|EU239387.1|_G_aff._steyaertanum_C16722

gi|165941432|gb|EU239388.1|_G_aff._steyaertanum_C17274

gi|170791139|gb|EU498090.1|_G_lucidum_strain_Glu5108

gi|170791140|gb|EU498091.1|_G_lucidum_strain_0537-8851472

gi|189098236|gb|EU701010.1|_G_boninense_strain_FA5035

gi|194173357|gb|EU841913.1|_G_boninense_strain_FA5017

gi|257479969|gb|FJ655452.1|_G_adersum_isolate_TN20

gi|259018716|gb|FJ687271.1|_G_lucidum_isolate_NH010

gi|270037334|gb|GU181349.1|_G_lucidum

gi|281413420|gb|GU207321.1|_G_lucidum_isolate_2-4Ch

gi|281413421|gb|GU207322.1|_G_lucidum_isolate_3-3KL

gi|281413422|gb|GU207323.1|_G_lucidum_isolate_4-1JA

gi|281413423|gb|GU207324.1|_G_lucidum_isolate_D-102K

gi|291359247|gb|GU731555.1|_G_adersum_strain_CIRM-BRFM_1136

gi|291359250|gb|GU731558.1|_G_lucidum_strain_CIRM-BRFM_885

gi|294774954|gb|GU207320.2|_G_lucidum_isolate_10-89UK

gi|297515570|gb|HM130563.1|_G_lucidum_isolate_AI-1

gi|297515571|gb|HM130564.1|_G_lucidum_isolate_AI-2

gi|297515572|gb|HM130565.1|_G_lucidum_isolate_AI-3

gi|297515573|gb|HM130566.1|_G_lucidum_isolate_AI-4

gi|315272108|gb|HQ589218.1|_G_lucidum_isolate_CAW-29

gi|315272115|gb|HQ589225.1|_G_lucidum_isolate_CAW-38

Sample_NJ4

Sample_NJ63.1

Sample_NJ63.2

Sample_NJ63.4

Sample_NJ63.6

;

end;

begin characters;

dimensions nchar=192;

format missing=? gap=- matchchar=, datatype=nucleotide;

matrix

G_lucidum_BCC

ATGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGC-C-GTGCAC-----CCTC-TCCACT-CAACACCT

GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTG-AGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCCTG

AAGCGGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAGATTCTATAAAGTATTATAATGTGTATTG-

-CGATGTAACCC

gi|122831068|gb|EF188280.1|_G_lucidum_isolate_wjg128
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATT--GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCG
GAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTAACAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACAC

gi|162296310|gb|EU162053.1|_G_adspermum_strain_CBS_351.74
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTACGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCTCCTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGAGT-CGCGAAACAGGCCCGTTCAATT---CGGGCTTGCG
GAGCGCACTTGTGCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|165941428|gb|EU239384.1|_G_aff._steyaertanum_T210
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC--GTAAAACGGGTCCSTTTAC----CGGGCTTGCG
GAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTTATATCACAACTCTATAAAGTATCARAATGTGTATCG-
-CGATGTAACGC

gi|165941429|gb|EU239385.1|_G_aff._steyaertanum_T211
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC--GTAAAACGGGTCCSTTTAC----CGGGCTTGCG
GAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-TRTCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATCG-
-CGATGTAACGC

gi|165941430|gb|EU239386.1|_G_aff._steyaertanum_C16452
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTATCACAAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|165941431|gb|EU239387.1|_G_aff._steyaertanum_C16722
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTACGGGT-CGTGAAACGGGCTCGTTTATT---CGGGCTTGCG
GAGCGCACTTGTGCTGCGTT-TATCACAACTCTGTAAAGTATCAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|165941432|gb|EU239388.1|_G_aff._steyaertanum_C17274
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC--GTAAAACGGGTCCCTTTAC----CGGGCTCGCG
GAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATCTG
CCGATGTAACGC

gi|170791139|gb|EU498090.1|_G_lucidum_strain_Glu5108
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|170791140|gb|EU498091.1|_G_lucidum_strain_0537-8851472
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATT--GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCG
GAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTAACAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACAC

gi|189098236|gb|EU701010.1|_G_boninense_strain_FA5035
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT

GTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|194173357|gb|EU841913.1|_G_boninense_strain_FA5017
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|257479969|gb|FJ655452.1|_G_adspersum_isolate_TN20
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTACGAGGCAT-GTGAC-----GCTCATCCGCTCCTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACGAGT-CGCGAAACAGGCCCGTTCAATT---CGGGCTTGTG
GAGCGCACTTGTTCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|259018716|gb|FJ687271.1|_G_lucidum_isolate_NH010
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGCTTACAGATT--GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCG
GAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTAACAGAAATGTGTATTG-
-CGATGTAACAC

gi|270037334|gb|GU181349.1|_G_lucidum
-----TCCGAGGCAC-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|281413420|gb|GU207321.1|_G_lucidum_isolate_2-4Ch
-----TCCGAGGCAC-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|281413421|gb|GU207322.1|_G_lucidum_isolate_3-3KL
-----TCCGAGGCAC-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|281413422|gb|GU207323.1|_G_lucidum_isolate_4-1JA
-----TCCGAGGCAC-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|281413423|gb|GU207324.1|_G_lucidum_isolate_D-102K
-----TCCGAGGCAC-GTGAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTTTACAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|291359247|gb|GU731555.1|_G_adspersum_strain_CIRM-BRFM_1136
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGACAGCCCTGCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACCTTACTGTGGGTATCAGATC--GTGAAGCGTGCTCTTTTACC---GGAGCTTGTG
AAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAAACACTATAAAGTATCAGAATGTGTATTA-

-CGATGTAACGC

gi|291359250|gb|GU731558.1|_G_lucidum_strain_CIRM-BRFM_885

-----TCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|294774954|gb|GU207320.2|_G_lucidum_isolate_10-89UK

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|297515570|gb|HM130563.1|_G_lucidum_isolate_AI-1

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|297515571|gb|HM130564.1|_G_lucidum_isolate_AI-2

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|297515572|gb|HM130565.1|_G_lucidum_isolate_AI-3

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|297515573|gb|HM130566.1|_G_lucidum_isolate_AI-4

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|315272108|gb|HQ589218.1|_G_lucidum_isolate_CAW-29

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCATTTACTGTGGGTTTCAGATC--GTAAAACGGGTCCCTTAC----CGGGCTTGCG
GAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATCATAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

gi|315272115|gb|HQ589225.1|_G_lucidum_isolate_CAW-38

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC--GTAAAACGGGTCCCTTAC----CGGGCTTGCG
GAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-TATCACAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTAATG-
-CGATGTAACGC

Sample_NJ4

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTATCACAAACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

Sample_NJ63.1

CTGGA--GTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

Sample_NJ63.2

CTGTGTTGTATGTGGCCTTCCGAGGCATCGAGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCTCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGA

Sample_NJ63.4

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

Sample_NJ63.6

CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCT
GTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCG
AAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTTTTATCACAACACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG-
-CGATGTAACGC

;

end;

Annexe 6

DHPLC : Les séquences de NCBI en fasta

```
>G_lucidum_BCC
ATGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGC-C-GTGCAC-----CCTC-TCCACT-CAACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTG-AGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCCTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAGATTCTATAAAGTATTATAATGTGTATTG--CGATGTAACCC
>gi|122831068|gb|EF188280.1|_G_lucidum_isolate_wjgl28
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATT-GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCGGAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTAAACAGAATGTGTATTG--CGATGTAACAC
>gi|162296310|gb|EU162053.1|_G_adsperum_strain_CBS_351.74
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTACGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCTCCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTACGAGT-CGCGAAACAGGCCCGTTTCATT---CGGGCTTGTTGGAGCGCACTTGTTGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|165941428|gb|EU239384.1|_G_aff._steyaertanum_T210
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC-GTAAACGGGTCCSTTTTC---CGGGCTTGCGGAGCGTGTCTG-
TGCCTGCGTTTATATCACAAACTCTATAAAGTATCARAATGTGTATCG--CGATGTAACGC
>gi|165941429|gb|EU239385.1|_G_aff._steyaertanum_T211
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC-GTAAACGGGTCCSTTTAC---CGGGCTTGCGGAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-
TRTCACAAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATCG--CGATGTAACGC
>gi|165941430|gb|EU239386.1|_G_aff._steyaertanum_C16452
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATATCACAAACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|165941431|gb|EU239387.1|_G_aff._steyaertanum_C16722
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTACGGGT-CGTGAAACGGGCTCGTTTATT---CGGGCTTGTCGAGCGCACTTGTTGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTGTAAAGTATCAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|165941432|gb|EU239388.1|_G_aff._steyaertanum_C17274
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATC-GTAAACGGGTCCSTTTAC---CGGGCTCGCGGAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATCTGCCGATGTAACGC
>gi|170791139|gb|EU498090.1|_G_lucidum_strain_Glu5108
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|170791140|gb|EU498091.1|_G_lucidum_strain_0537-8851472
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATT-GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCGGAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTAAACAGAATGTGTATTG--CGATGTAACAC
>gi|189098236|gb|EU701010.1|_G_boninense_strain_FA5035
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAAACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|194173357|gb|EU841913.1|_G_boninense_strain_FA5017
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAAACTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|257479969|gb|FJ655452.1|_G_adsperum_isolate_TN20
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTACGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCGCTCCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTACGAGT-CGCGAAACAGGCCCGTTTCATT---CGGGCTTGTTGGAGCGCACTTGTTGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|259018716|gb|FJ687271.1|_G_lucidum_isolate_NH010
CCGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGCTTCAGATT-GCGAGGCACGCTCTTT-AC----CGGGCTTGCGGAGCATATCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTAAACAGAATGTGTATTG--CGATGTAACAC
>gi|270037334|gb|GU181349.1|_G_lucidum
-----TCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
>gi|281413420|gb|GU207321.1|_G_lucidum_isolate_2-4Ch
-----TCCGAGGCAC-GTGCAC-----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAAACTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC
```

>gi|281413421|gb|GU207322.1|_G_lucidum_isolate_3-3KL
-----TCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|281413422|gb|GU207323.1|_G_lucidum_isolate_4-1JA
-----TCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|281413423|gb|GU207324.1|_G_lucidum_isolate_D-102K
-----TCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|291359247|gb|GU731555.1|_G_ adspersum_strain_CIRM-BRFM_1136
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCACGCCCTGCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTATCAGATC--GTGAAGCGTGCTCTTTTACC---GGAGCTTGTGAAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATCAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|291359250|gb|GU731558.1|_G_lucidum_strain_CIRM-BRFM_885
-----TCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|294774954|gb|GU207320.2|_G_lucidum_isolate_10-89UK
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|297515570|gb|HM130563.1|_G_lucidum_isolate_AI-1
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|297515571|gb|HM130564.1|_G_lucidum_isolate_AI-2
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|297515572|gb|HM130565.1|_G_lucidum_isolate_AI-3
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|297515573|gb|HM130566.1|_G_lucidum_isolate_AI-4
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAC-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC-TGTGAAGCGTGCCCTT-GCG---GGGCTTCGTGAAGCGCGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|315272108|gb|HQ589218.1|_G_lucidum_isolate_CAW-29
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCATTTACTGTGGGTTTCAGATC--GTAAACGGGTCCCTTTAC----CGGGCTTGCGGAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATCATAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>gi|315272115|gb|HQ589225.1|_G_lucidum_isolate_CAW-38
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCAT-GTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTTCAGATC--GTAAACGGGTCCCTTTAC----CGGGCTTGCGGAGCGTGTCTG-TGCCTGCGTT-
TATCACAACCTCTATAAAGTATCAGAATGTGTAATG--CGATGTAACGC

>Sample_NJ4
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>Sample_NJ63.1
CTGGA--GTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>Sample_NJ63.2
CTGTGTGTATGTGGCCTTCCGAGGCATCGAGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCTCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>Sample_NJ63.4
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC

>Sample_NJ63.6
CTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATCGTGCAC----GCTCATCCACT-CTACACCTGTGCACCTTACTGTGGGTTATAGATCGTGTGGAGCGAGCTCGTTCGTTTGACGAGTTTGCGAAGCGCGTCTG-
TGCCTGCGTTTATCACAACCTCTATAAAGTATTAGAATGTGTATTG--CGATGTAACGC